ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI ÜREME POTANSİYELİ VE ETKİNLİK FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Gizem ÖZBUDAK

T.C.
BURSA ULUDAĞ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI ÜREME POTANSİYELİ VE ETKİNLİK FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Gizem ÖZBUDAK
0000-0002-4423-2490

Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK
(Danışman)

YÜKSEK LİSANS
BİTKİ KORUMA ANABİLİM DALI

BURSA–2021
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

Yüksek Lisans

ENTOMOPATOJEN NEMATOD *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HİBRİT IRKININ *IN VIVO* VE *IN VITRO* ÜRETİM SONRASI ÜREME POTANSİYELİ VE ETKİNLİK FARKLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI

Gizem ÖZBUDAK

Bursa Uludağ Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bitki Koruma Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

Entomopatojen nematod (EPN) *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı, simbiyotik bakteri olan *Photorhabdus* ile mutualist bir ilişki içindedir. Bu mutualist ilişki, EPN' lerin tarımsal açıdan bazı zararlılara karşı, kimyasal insektisitlere alternatif olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. EPN' ler *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere iki ayrı yöntem ile üretilmektedir. *In vivo* üretim, genellikle laboratuvar çalışmalarında az miktarda üretilmiş olan nematod kültürlerinin devamlılığı ve muhafazası için kullanılan canlı materyal üzerinde bir yöntemdir. Fakat bu yöntem EPN' lerin ticari amaçla kitlesel üretiminde yeterli olmamaktadır. Kitlesel üretim amacıyla, yapay besiyeri kullanılarak *in vitro* yöntemiyle EPN üretimi yapılmaktadır.

In vivo üretim ile elde edilen infektif juveniller (IJ), üreme potansiyelini tespit etmek amacıyla *Galleria mellonella* larvalarına karşı uygulanmıştır. Bu larvalar disekte edildiğinde *H. bacteriophora* HBH ırkına ait hermafrodit birey sayısının (140) 4. günde maksimum seviyede olduğu ve en düşük hermafrodit birey sayısının (95,8) 3. günde elde edildiği tespit edilmiştir. *In vitro* üretim ile elde edilen *H. bacteriophora* HBH ırkı, *G. mellonella* larvalarına karşı uygulandığında ise en yüksek hermafrodit sayısı (86) 6. ve 7. gün tespit edilirken, en düşük hermafrodit sayısı (47,5) 4. gün tespit edilmiştir. Ayrıca, *H. bacteriophora* HBH ırkı EPN' lerin etkinliğinin belirlenmesi amacıyla *G. mellonella* larvaları kullanılmıştır. Bu uygulamada 10 IJ/larva dozunda, *in vivo* üretim sonucu elde edilen *H. bacteriophora* HBH ırkının *G. Mellonella* üzerinde ölüm oranı %100 olurken, *in vitro* üretim sonucu *G. mellonella* ölüm oranı %85,6 olmuştur. Özetle, bu tez çalışması *in vivo* ve *in vitro* üretim yöntemleri EPN' lerin etkinlik ve üreme potansiyellerini önemli ölçüde değiştirebileceği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *In vivo* üretim, *In vitro* üretim, Entomopatojen nematod , *Heterorhabditis bacteriophora* HBH.

2021, vii + 68 sayfa.

ABSTRACT

MSc Thesis

INVESTIGATION ON COMPARISON OF REPRODUCTIVE POTENTIALS AND EFFICACIES OF THE ENTOMOPATHOGENIC NEMATODE *Heterorhabditis bacteriophora* HBH HYBRID STRAIN AFTER *IN VIVO* AND *IN VITRO* PRODUCTIONS

Gizem ÖZBUDAK

Bursa Uludağ University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Plant Protection

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK

The strain *Heterorhabditis bacteriophora* HBH, an entomopathogenic nematode (EPN), is with the symbiotic bacterium *Photorhabdus*. This mutualistic relationship allows EPNs to be used as an alternative to chemical insecticides against some agricultural pests. EPNs are produced by two different methods, *in vivo* and *in vitro*. *İn vivo* production is a method on living material used for the maintenance and preservation of nematode cultures that are usually produced in small quantities in laboratory studies. However, this method is not sufficient for mass production of EPNs for commercial purposes. For mass production, EPN is produced by *in vitro* method using artificial media.

Infective juveniles of *Heterorhabditis bacteriophora* HBH obtained by *in vivo* production were applied against *Galleria mellonella* larvae to determine their reproductive potential. When these larvae were dissected, it was determined that the number of hermaphrodite individuals belonging to the *H. bacteriophora* HBH strain was at the maximum level (140) on the 4th day and the lowest number (95,8) of hermaphrodite individuals was obtained on the 3rd day. When *H. bacteriophora* HBH strain obtained by *in vitro* production was applied against *G. mellonella* larvae, the highest hermaphrodite number (86) was detected on the 6th and 7th day, while the lowest number of hermaphrodites (47.5) was determined on the 4th day. In addition, *G. mellonella* larvae were used to determine the effectiveness of *H. bacteriophora* HBH strain EPNs. In this application, at a dose of 10 IJ/larvae, the mortality rate of *H. bacteriophora* HBH strain obtained as a result of *in vivo* production on *G. mellonella* was 100%, while the mortality rate of *G. mellonella* as a result of *in vitro* production was 85.6%. In summary, at the end of this thesis, it has been determined that *in vivo* and *in vitro* production methods can significantly change the efficacy and reproductive potential of EPNs.

Key words: *In vivo*, *In vitro*, Entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* HBH.
2021, vii + 68 pages.

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasının her aşamasında engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her konuda yardım ve desteğini esirgemeyen danışman hocam Sayın Prof. Dr. İsmail Alper SUSURLUK' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisans ve Yüksek Lisans eğitimim süresince eğitim hayatıma katkıda bulunan Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi' nin değerli hocalarıyla tez çalışmasının yürütülmesinde tecrübelerini benden esirgemeyerek her fırsatta yardımcı olan değerli hocam Sayın Ar. Gör. Yavuz Selim ŞAHİN' e, Dr. Öğr. Üyesi Tufan Can ULU' ya ve Büşra SADIÇ' a teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamda finansal destek sağlayan 219O370 nolu proje için TÜBİTAK TOVAG'a teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca desteğini esirgemeyen babam İsmail ÖZBUDAK' a teşekkürlerimi sunarım.

Gizem ÖZBUDAK
06/07/2021

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET i
ABSTRACT ii
ÖNSÖZ VE/VEYA TEŞEKKÜR iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
ÇİZELGELER DİZİNİ viii
1. GİRİŞ 1
2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 8
2.1. Etkinlik Kaynak Araştırması 8
2.2. Üreme Potansiyeli Kaynak Araştırması 16
3. MATERYAL ve YÖNTEM 18
3.1. Laboratuvarda *Galleria mellonella* Larvalarının Üretimi 18
3.2. Yem hazırlanışı 19
3.3. Çalışmada Kullanılan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkı 22
3.4. *In vivo* EPN Üretimi 25
3.5. *In vitro* EPN Üretim Aşamaları 28
3.5.1. Simbiyont Bakteri İzolasyonu 28
3.5.2. NBTA Agar İçeriği 29
3.5.3. YS Sıvı Besin Ortamı 29
3.5.4. WOUTS Agar İçeriği 29
3.5.5. Yumurta İzolasyonu İşlemi 32
3.6. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının Üreme Potansiyeli 37
3.7. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Etkinliği 39
3.8. İstatistiksel Analizler 40
4. BULGULAR 41
4.1. *In vivo* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Üreme Potansiyeli 41
4.2. *In vivo* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının *Galleria mellonella*' ya Karşı Etkinliği 43
4.3. *In vitro* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Üreme Potansiyeli 45
4.4. *In vitro* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının *Galleria mellonella*' ya Karşı Etkinliği 47
4.5. *In vivo* ve *In vitro* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkı EPN' lerin Üreme Potansiyelinin Karşılaştırılması 49
4.6. *In vivo* ve *In vitro* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkı EPN' lerin Etkinliğinin Karşılaştırılması 51
5. TARTIŞMA ve SONUÇ 54
KAYNAKLAR 54
ÖZGEÇMİŞ 67

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simgeler	Açıklama
g	Gram
kg	Kilogram
l	Litre
m	Metre
m^2	Metrekare
m^3	Metreküp
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mm	Milimetre
µm	Mikrometre
ºC	Santigrat derece
cm	Santimetre
cm^2	Santimetrekare

Kısaltmalar	Açıklama
dk	Dakika
L	Linnaeus
EPN	Entomopatojen nematod
IJ	İnfektif Jüvenil
J_3	Üçüncü dönem larva
J_4	Dördüncü dönem larva
spp.	Species (çoğul)
NBTA	Nutrient bromothymol blue agar
YS	Yeast extract and salt
WOUTS	Nutrient lipid agar

.

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1.1. Entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora*' nın farklı gelişim evrelerinin mikroskobik görüntüleri
A) Yumurtalar. B) J_1 evresi. C) J_2 evresi. D) J_3 evresi. E) Infektif juvenil. F) IJ_4 evresi. G) Hermafrodit (ok gelişmemiş vulvayı gösterir). H) Olgunlaşmış hermafrodit (ok çıkıntılı vulvayı gösterir). I) Erkek birey (ok, spikulayı gösterir). 4
Şekil 3. 1. Etüv ile ortam şartları korunarak besin içerisinde yetiştirilen *Galleria mellonella* larvaları 19
Şekil 3. 2. Farklı *Galleria mellonella* dönemlerinin inkübatör içerisindeki bulunduğu kavanozlar 20
Şekil 3. 3. Olgun larva ayıklama işlemi için kavanozdaki karışımın çıkarılması işlemi 20
Şekil 3. 4. Etüv ile ortam şartları korunarak besin içerisinde yetiştirilen *Galleria mellonella* larvaları görünümü 21
Şekil 3. 5. Yem içerisine eklenen larvaların görüntüleri 21
Şekil 3. 6. +4C' de muhafaza edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH kültürleri ... 22
Şekil 3. 7. +4C' de muhafaza edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH kültürleri ... 23
Şekil 3. 8. Doz belirleme sonrası kültür kaplarının üzerindeki bilgiler 23
Şekil 3. 9. EPN' lerin stok olarak muhafaza edildiği kültür kapları 24
Şekil 3. 10. Enfeksiyon denemelerinde kullanılan 24 kuyucuklu plate 24
Şekil 3. 11. Toprakta yapılan enfeksiyon denemesi 25
Şekil 3. 12. Toprakta yapılan enfeksiyon denemesi 26
Şekil 3. 13. Üzerine IJ bırakılmış parafilm ile kapatılmış toprak enfeksiyon denemesi. 26
Şekil 3. 14. Kültüre alınmış *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı yeni bireyleri.... 27
Şekil 3. 15. NBTA agar üzerine ekimi yapılmış olan *Photorhabdus* 30
Şekil 3. 16. YS sıvısı bakteri süspansiyonu 30
Şekil 3. 17. Bakterinin Wouts agara ekimi ve 48 saat sonrasında belirginleşen renk değişimi 31
Şekil 3. 18. Enfesiyon denemesinden alınmış topraklarından arındırmak için yıkanmış enfekteli *Galleria mellonella* larvaları 34
Şekil 3. 19. Disekte edilmiş olan *Galleria mellonella* larvaları 34
Şekil 3. 20. Disekte edilmiş olan larvadan toplanmış *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı hermafrodit bireyleri 34
Şekil 3. 21. Yumurta izolasyonu (A-B: Hermafrodit bireylerin yıkanması. C: Vorteks ile hermafrodit bireylerin parçalanması. D: Yumurtaların ependorf tüplere alınması. E: Santrifüj. F: YS ortamının kuyucuklara eklenmesi. G: Yumurtaların YS ortamına aktarılması. H: 24 kuyucuklu kültür kabının parafilmle kapatılması. İ: Yumurtaların mikroskobik görünümü.) 35
Şekil 3. 22. *İn vitro* sonrası IJ çıkışları (A: Açılmaya hazır olan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH yumurtalarının, bakterili besiyerine eklenmesi. B-C: Yumurtaların mikroskopta incelenmesi. D: Agar üzerindeki *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin mikroskobik görüntüsü. E: IJ' lerin petri kapağındaki mikroskobik görüntüsü). 36
Şekil 3. 23. Enfekte olan *Galleria mellonella* larvalarının açılması (diseksiyon) 38
Şekil 3. 24. Hermafrodit bireylerin sayımı 38

Şekil 3. 25. *Galleria mellonella* larvalarının belirli dozlarda enfeksiyon denemelerinin kurulumu 39
Şekil 3. 26. Enfekte edilen *Galleria mellonella* larvalarının bulunduğu kuyucuklu kapların etiketlenmesi 40
Şekil 3. 27. Enfekte olan *Galleria mellonella* larvalarının canlı ve ölü sayılarının belirlenmesi 40
Şekil 4. 1. *In vivo* üretim sonucu oluşan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerin oluşturduğu enfeksiyon denemesi sonucu *Galleria mellonella* larvası olan kadavralar içerisinden çıkan ve sayımı yapılan hermafrodit birey sayısı 42
Şekil 4. 2. *In vivo* üretim sonucu oluşan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı bireylerin oluşturduğu enfeksiyon denemesi sonucu uygulama dozlarına göre *Galleria mellonella* larvalarının ölüm oranı 44
Şekil 4. 3. *In vitro* üretim sonucu oluşan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının üreme potansiyeli grafiği 46
Şekil 4. 4. *In vitro* üretim sonucu oluşan Heterorhabditis bacteriophora HBH ırkı bireylerin oluşturduğu enfeksiyon denemesi sonucu uygulama dozlarına göre *Galleria mellonella* larvalarının ölüm oranı 48
Şekil 4. 5. *In vivo* ve *in vitro* üretim sonucu elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı bireylerin *Galleria mellonella* larvalarına karşı üreme potansiyelinin karşılaştırılması grafiği 50
Şekil 4. 6. *In vivo* ve *in vitro* sonucu elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı bireylerin *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki etkinliğinin karşılaştırılması grafiği 53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3. 1. *Galleria mellonella* Besininin İçeriği 19
Çizelge 3. 2. Ringer Solüsyonu İçeriği 22
Çizelge 3. 3. NBTA Agar İçeriği 29
Çizelge 3. 4. YS Sıvı Besin Ortamı 29
Çizelge 3. 5. WOUTS Agar İçeriği 32
Çizelge 3. 6. Sterilizasyon Solüsyonu 33

1. GİRİŞ

Tarımsal mücadele, ekonomik açıdan önemli bitkilerin zararlı, hastalık ve yabancı otlar dolayısıyla ekonomik ölçütler kapsamında korunarak, ürün kalitesinin ve veriminin yükseltilmesidir (Delen ve ark. 2005). Kimyasal ilaç kullanımının doğurduğu problemlerden dolayı araştırmacılar etkili ve güvenilir bir savaşım yöntemi arayışı içerisine girmişlerdir. Dolayısıyla doğa dostu olması ile etkisi uzun süre gözlemlenebilen bir mücadele yöntemi olan biyolojik mücadele ön planda tutulmaktadır. Biyolojik mücadele, zararlıların popülasyonlarını düşürmek için kimyasal maddeler yerine popülasyonlarını düşürecek diğer canlıların kullanılmasıyla gerçekleşen bir mücadele yöntemidir. Biyolojik mücadelede, zararlı yoğunluğu ekonomik zarar düzeyinin altında tutulmakta, böylece söz konusu zararlıların doğal düşmanlarının doğada sürekliliğinin sağlanması hedef alınmaktadır. Doğal yaşamda yer alan canlı etkenlerden biri olan doğal düşmanların, insan faktörünün desteği ile hastalık ve zararlıların olumsuz etkilerini azaltmak için uygulanan tüm girişimlerdir (Toros ve Maden 1991).

Bu yararlı organizmaların çevre ve insan sağlığına karşı olumsuz etkisinin olmaması, doğal dengeyi bozmaması en önemli özelliklerindendir. Ayrıca yararlı organizmaların kimyasallara dayanıklılık sorunlarını ortadan kaldırması ve etkinliğinin sürekli olması biyolojik mücadelenin özellikleri arasında büyük bir avantaj sağladığını göstermektedir (Öncüer 1995). Biyolojik mücadelede önemli olan EPN, ilk kez 1923 yılında bulunmuştur. 1970' lerin sonundan günümüze kadar tarımsal zararlılara karşı artış göstererek uygulanmıştır (Nickle 1984, Gaugler ve Han 2002a, Kaya ve ark. 2006). Bu nematodların ticari üretim düzeyinde üretilmesi için *in vitro* üretim ortamı şartlarındaki üreme yetenekleri dikkate alınarak geliştirilmiştir. Böylece ticari üretim düzeyine uygun üretim yapılmıştır (Klein 1990, Ehlers 2001).

EPN' ler, Nemata şubesi, Secernentea sınıfı, Rhabditida takımının Heterorhabditidae ve Steinernematidae familyalarına bağlı, biyolojisinin %90' ından fazlasını toprakta geçiren, biyolojilerinin devamı için konukçu bir böceğe ihtiyaç duyan obligat endoparazit canlılardır. Mikroskobik ölçülerde olan EPN' lerin boyları türe göre

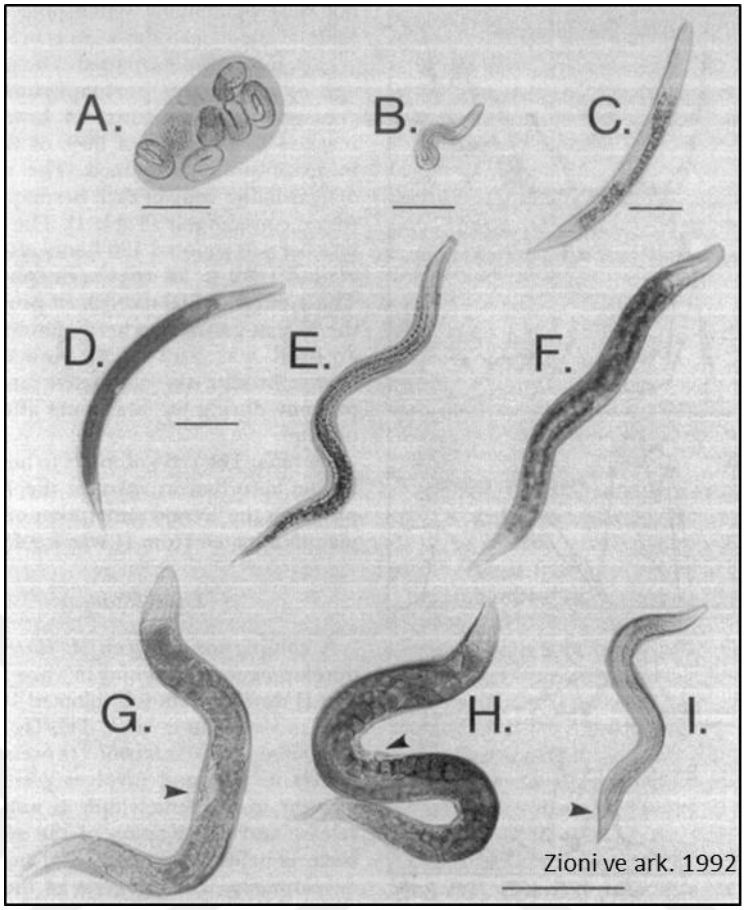
değişmekle birlikte ortalama 500-1000 µm arasındadır (Nguyen ve Smart 1995). EPN' ler, biyolojik ajanlar arasında aktif ve etkili bir biçimde kullanılan gruplardan biridir (Gaugler 2002a). EPN' ler biyolojik mücadele içerisinde büyük bir öneme sahiptirler ve özellikle toprak altı zararlılarına karşı kullanılmaktadırlar. EPN' ler toprak altı zararlılarına karşı pestisitlerden %40-50 oranında daha etkili olmaktadır (Ehlers ve Peters 1995, Sulistyanto ve Ehlers 1996). Toprak üstünde zarar yapan, ancak belirli bir hayat dönemini toprakta ya da ağaç kabuklarının altında geçiren *Cydia pomonella* L. (Lepidoptera: Tortricidae), *C. splendana* Hübner, 1799 (Lepidoptera: Tortricidae), *Ceratitis capitata* Wiedemann, 1824 (Diptera: Tephritidae), *Rhagoletis cerasi* L. (Diptera: Tephritidae), Tripsler (Thysanoptera Haliday 1836), *Hoplocampa spp.* L. (Hymenoptera: Tenthredinidae), *Curculio elephas* Gyllenhal, 1836 (Coleoptera: Curculionidae) ve *C. nucum* L. (Coleoptera: Curculionidae) gibi ekonomik açıdan önemli zararlılara karşı etkin olarak kullanılabilmektedir (Peters 1996).

Dünya genelinde birçok bölge ve iklimde yaşayabildikleri saptanan EPN' lerin (Griffin ve ark. 1990, Poinar 1990, Hominick ve ark. 1996, Hominick 2002), geniş konukçu aralığına sahip olduğu ve hedef alınmayan diğer organizmalara olumsuz etkisinin olmadığı görülmüştür (Peters 1996, Lacey ve ark. 2015). Ayrıca aktif bir şekilde konukçu arama yeteneklerinin olduğu gözlemlenmiştir (Lewis ve ark. 1992, Grewal ve ark. 1994). Birçok tarım alet ve makinası ile rahatlıkla uygulanabilir olduğu bilinmektedir (Georgis 1990, Koppenhöfer 2000, Wright ve ark. 2005). Birçok pestisit ile uyumluluğu ve açık alanlarda uygulama için *in vitro* sıvı kültürde kitle olarak üretilebilmeleri, EPN' lerin pestisitlere iyi bir alternatif olduğunu göstermiştir (Rovesti ve ark. 1988, De Nardo ve Grewal 2003, García del Pino ve Jové 2005, Ulu ve ark. 2016, Ehlers ve ark. 1998, Ehlers 2001, Gaugler ve ark. 2002b, El-Sadawy 2011). Böylece EPN' ler daha cazip hale gelmiştir. EPN' ler, diğer tüm nematodlarda olduğu gibi yumurta, dört adet jüvenil ve ergin olmak üzere üç farklı döneme sahiptir. EPN' lerin konukçu dışında yaşayan en önemli evresi olan ve üçüncü dönem jüvenillerin özel formu olan infektif jüvenilleri (IJ), toprak altında aylarca aktif şekilde konukçularını arayabilme ve beslenmeden yaşayabilme özelliğine sahiptirler (Glazer 2002). Ancak 3. dönem larva (IJ) evresinde konukçudan ayrılmaktadırlar. Biyolojik dönemlerini böcek vücudu içinde tamamlamaktadır. Bunun sonucunda böceğin ölümüne neden olmaktadır.

Steinernematidler sindirim sistemlerinde özel bir kese içinde bulunan bakterilerle simbiyotik bir ilişki içinde yaşamaktadırlar. Fakat Heterorhabditler de sindirim sisteminde dağınık halde durmaktadır. Bu bakteriler gram (-) tipte olup *Photorhabdus* ve *Xenorhabdus* cinslerine bağlı türlerdir (Boemare ve ark. 1993). Her EPN cinsi kendine özgü bir bakteri türüyle bu ilişkiyi sürdürmektedir (Pütz ve ark. 1990). Uygun çevre şartları altında *Heterorhabditis bacteriophora* HBH türünün IJ' lerinin toprakta 22 ay boyunca etkinlik sağlayabildiği tespit edilmiştir (Susurluk ve Ehlers 2008).
Heterorhabitidler ile Steinernematidlerin hayat döngüleri oldukça benzer olmasına rağmen aralarında bazı farklılıklar bulunmaktadır. En önemlisi; *Steinernema* spp. türü erginlerinin bütün jenerasyonlarda ayrı eşeyli olmasına rağmen *Heterorhabditis* spp. türü erginlerinin konukçu içerisinde ilk jenerasyonda hermafrodit bireylerden oluşmasıdır. Heterorhabditidae familyasında ise ilk dölündeki bireyler hermafrodittir. Bunu takip eden döllerde ise hem hermafrodit hem de ayrı eşeylere rastlanır (Lewis ve Clarke 2012).

Heterorhabditis türlerinde görülen hermafrodit bireylerde dişi ve erkek üreme sistemi bir bireyde bulunur. Hermafodit bireyler; EPN' lerin üreme kapasiteleri açısından önem teşkil etmektedirler. Bunun nedeni olarak; hermafrodit bireylerle diğer nematodlardaki eşeyli üreme karşılaştırıldığında hermafrodit bireylerde üremenin daha fazla olduğu görülmektedir. Üremenin hızlı olması da biyolojik ajanın kullanılması ve üretilmesinde önemli paya sahiptir.

IJ, böceğe penetre olduktan sonra deri değiştirerek 4. jüvenil dönemine geçişi gözlemlenir. Nematod bakteriyi ağız veya anüs açıklığı ile zararlı hemolimfine salımını sağlamaktadır (Poinar ve ark. 1977). EPN' ler ile simbiyotik bakteriler arasında mutualistik bir yaşam gözlenmektedir. Bunun sonucunda septisemi bir diğer tabiri kan zehirlenmesi nedeni ile 48 saat süre içerisinde zararlıyı öldürebilmektedirler (Kaya ve Gaugler 1993, Smart 1995, Ünlü ve Özer 2003, Şahin ve ark. 2018, Gözel ve Gözel 2019, Şahin ve Gözel 2019).



Şekil 1.1. Entomopatojen nematod *Heterorhabditis bacteriophora*'nın farklı gelişim evrelerinin mikroskobik görüntüleri A) Yumurtalar. B) J_1 evresi. C) J_2 evresi. D) J_3 evresi. E) İnfektif juvenil. F) IJ_4 evresi. G) Hermafrodit (ok gelişmemiş vulvayı gösterir). H) Olgunlaşmış hermafrodit (ok çıkıntılı vulvayı gösterir). I) Erkek birey (ok, spikulayı gösterir).

Günümüz çalışmalarında biyolojik mücadele kapsamında bazı ülkelerde EPN' lerin (Rhabditida: Steinernematidae, Heterorhabditidae) ticari preparatları üretilmekte ve zararlı böceklere karşı etkin biçimde kullanılmaktadır (Grewal ve ark. 2005). Bazı EPN' lerin konukçuya spesifik olmaları, yararlı olan canlılara ve doğaya zarar vermemeleri açısından bakıldığında biyolojik mücadelede kullanılan EPN' leri insektisitlerden farklı kılan önemli özelliklerindendir. (Smart 1995).

EPN' lerin üretiminde iki farklı yöntem kullanılmaktadır. Bunlar *in vivo* ve *in vitro* üretim yöntemleridir (Friedman 1990, Lunau ve ark. 1993, Gaugler ve Han 2002b, Shapiro-Ilan ve Gaugler 2002). Laboratuvar çalışmaları, ufak boyutta arazi denemeleri ve sera gibi çalışmalar için *in vivo* yöntem kullanılırken, ticari boyutta üretim ve geniş alana kurulmuş uygulamalar için ise *in vitro* yöntem kullanılmaktadır. Genellikle *in vivo* yöntem de canlı materyal olarak *G. mellonella* larvası kullanılmaktadır. Çünkü laboratuvar koşullarında yetiştirilmesi zor olmayan, aynı zamanda EPN' lere karşı duyarlı olan larva, bu üretim içinde ideal konukçu olmaktadır (Kaya ve Gaugler 1993). *In vivo* üretimdeki en önemli ve hassas aşama ise EPN' lerin uygulanması için belirlenen dozdur (Zervos ve ark. 1991, Boff ve ark. 2000). EPN uygulanmış larvanın, *H. bacteriophora* bakterisi ile enfeksiyon denemesi sonucu koyu kırmızı renkte gözlemlenmesi en karakteristik semptomudur (Woodring ve Kaya 1988). Biyolojik mücadelede doğal etmenin kullanılabilmesi için gerekli en önemli etkenlerden biri olan üretim maliyetidir. *In vivo* ortamda EPN' lerin kitlece üretilmesi *in vitro* üretime göre uzun süreçli bir işlem olmakla birlikte elde edilen EPN sayısı da *in vitro* üretim sonucundan azdır. (Fridman ve ark. 1990, Ehlers 1996, 2001, Gaugler ve Han 2002b). Çoğunlukla hayvansal kaynaklı olan besin maddeleri, saf su ve agar ile hazırlanan bu katı ortamlar sıvı ortamlara kıyasla daha kullanışlı, risksiz olduğu saptanmıştır. Bu yüzden katı ortam tercih edilmektedir. *In vitro* sıvı üretim ise erlenmeyer veya biyoreaktörde yapılmaktadır. *In vitro* sıvı üretim süreci riskli olmakla birlikte daha fazla emek ve iş isteyen, ancak üretim kapasitesi yönünden yüksek sonuçlar veren üretim metodudur. EPN' ler katı ortamda genellikle agarın üst yüzeyinde çoğalıp ürerken, sıvı ortamlarda ise bütün sıvıda üreme gözlemlenmektedir. Katı *in vitro* ortamının yüzeyi sınırlı bir seviyeye kadar arttırılabileceği için üretim kapasitesi de bu yüzden sınırlıdır. Sıvı ortam *in vitro* üretimde ise 250 ml' lik hacmi olan erlenden 100 tonluk olan biyoreaktörlere kadar çok seçeneği bulunmaktadır. Yıllarca ticari amaçla *in vivo* üretim kullanılmasına rağmen günümüzde ise ticari amaçla üretimin büyük orandaki bölümünü *in vitro* sıvı ortam yöntemi ile biyoreaktörlerde yapılmaktadır (Ehlers 1996 ve Ulu 2018).

Biyolojik mücadelede bir ajanının kitle üretimini ticari bir şekilde yapılabilmesi önemli bir özellik olarak ön plana çıkmasına karşı, üretim esnasındaki teknolojinin ve

maliyetlerin fazlalığı sebebiyle üretilmiş olan ürün fiyatı pahalı olmaktadır. Bu ürünün bu sebeplerden dolayı çiftçi tarafından kullanılma ve tercih edilme ihtimali azalmaktadır. EPN' lerin bu yapay ortamlardaki üretiminin tarihi göz önüne alınıp incelendiğinde ise yıllar boyunca çok fazla gelişme kat ettiği gözlenmektedir (Chavarría-Hernández ve ark. 2011, El-Sadawy 2011). Bu gözlemlenen gelişmelerin büyük çoğunluğu üretimi arttırmak ve üretimdeki maliyetlerini düşürmek veya üretim sonucunda elde edilmiş olan ürünün kalitesini artırmak gibi amaçlara hizmet etmektedir. EPN' ler ile alakalı çalışmalar çok uzun yıllardır yapılmasına karşın, fizyolojileri, ekolojileri, biyolojileri, davranışları hususunda tam anlamıyla anlaşılamayan birtakım noktalar saptanmaktadır. Bu sebeple çok fazla canlı, cansız etmenlerin EPN' lerin üzerinde oluşturduğu etki konusunda çalışmalar devam etmekte ve araştırılmaktadır. Bu araştırmalardan bazıları, kitlesel üretimi yapılmış olan yapay ortamların ve üretimleri esnasındaki bir takım çevresel etkenlerin üretime karşı olan bazı etkilerinin incelenmesidir (Hirao ve Ehlers 2009).

Her canlı kendilerine spesifik olan bazı genetik özellikleri bünyelerinde barındırmaktadırlar. Uzun yıllar boyunca yaşadıkları bölgelerin koşullarına uyum sağlamak için çeşitli adaptasyonlar geliştirmişlerdir (Ulu ve Susurluk 2014). EPN' ler bahsedilen bu özellikleri nedeniyle biyolojik mücadelede oldukça etkin biçimde kullanılmaktadır. Ancak 45 günlük saklanabilmesi açısından dezavantaj olarak belirtilmektedir. EPN' lerin üretimlerinin kalitesinin korunabilmesi için bazı metabolizma kaynaklı hareketlerinin yavaşlatılması gerekmektedir. Bu durum, EPN' lerin 10 °C' den düşük sıcaklıklarda depolanması gerektiğini göstermektedir. Özellikle bir yerden başka bir yere taşınmaları sırasında EPN' lerin uygun olmayan sıcaklık veya yüksek sıcaklıklara maruz kalmaları durumunda raf ömrü daha da azaltmaktadır (Strauch ve ark. 2000). Ek olarak *H. bacteriophora'* nın ise uygulanılan zararlılara karşı etkinliği çoğunlukla 10°C ila 35°C sıcaklık değerlerinin arasında olmakla sınırlıdır (Grewal ve ark. 1994).

Bu çalışmada, Bursa Uludağ Üniveresitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Nematoloji laboratuvarında üretilmiş olan EPN üstün ırk *H. bacteriophora* HBH hibrit ırkının *in vivo* ve *in vitro* katı ortam üretimleri sonucu etkinlik ve üreme potansiyeli

açısından incelenmesi ve karşılaştırılması araştırılmıştır. *In vivo* ve *in vitro* yöntemleri ile üretilen EPN' ler uygulanan belirli dozlardaki IJ sayısı ve IJ' lerin *G. mellonella* üzerindeki etkinlik parametreleri kullanılarak incelenmiştir. Ayrıca *in vivo* ve *in vitro* katı üretim sonucu oluşan hermafrodit sayımı yapılarak üreme potansiyelleri hesaplanmıştır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

2.1 Etkinlik Kaynak Araştırması

Salem ve ark. (2008), sıcaklığın 3. dönem olan IJ' lerin üremesi ve etkinliği kapsamında yaptıkları araştırmada *Heterorhabditis* ırkındaki bireylerin etkinlik açısından daha iyi bir oran verdiği sıcaklık değeri 20°C -30 °C arasında iken 15°C ve 35 °C sıcaklıklarda ise etkinlik açısından düşük oranlar verdiği gözlemlenmiştir.

Susurluk ve ark. (2009), çim teke böceği, *Dorcadion pseudopreissi* Breuning, 1962 (Coleptera: Cerambycidae)' ye karşı olarak *H. bacteriophora* ile olan etkinliğini araştırmak için laboratuvar şartlarında yaptıkları çalışma üzerinde zararlıya yönelik belirlenen 50, 100 ve 150 IJ/larva dozlarında 25 ºC' de *H. bacteriophora* uygulanarak nematodun zararlılara karşı olan etkinliğini araştırmışlardır. Elde edilen veriler doğrultusunda, sırası ile tüm doz uygulamalarındaki elde edilen etkinlik değerlerindeki veriler sırası ile %55, %65 ve %85 oranlarında olduğunu saptamışlardır.

Salame ve ark. (2010), tarım açısında zararlı olan toprak kaynaklı böceklere yönelik etkin mücadele imkânı sağlaması sebebi ile İsrail' deki bazı bölgelerinden izole edilmiş olan EPN ırkları ve bunların çevresel kaynaklı stres oluşturan faktörlere karşı dayanıklılıklarına, toprak içerisindeki hareket kabiliyetlerini ve enfeksiyon kapasitelerini incelemişlerdir. Araştırmada ulaşılmak istenen hedef ise bütün kriterler açısından en iyi olan ırkı seçerek biyolojik mücadele koşullarına adapte olmasını sağlamaktır. Bu sebeple, topraktan izole edilmiş olan ve denemede kullanılan ırklara puanlama yapılmıştır. Bu puanlama ile elde edilen sonuçlara bakıldığında en yüksek olan iki puan (+4 ve +3) *Steinernema feltiae* izolatları tarafından alınmışken, *Heterorhabditis* spp. ırkı izolatlarda ise en yüksek belirlenen puan ise 2 olarak belirlenmiştir. Ancak denemeye alınmış olan bu ırklar, ticari açıdan kullanılmakta olan ırklardan çoğu kritere göre daha olumlu performans çıkardığı gözlemlenmiştir.

Kaya ve ark. (1987) *Steinernema feltiae*, domates tohumu içeriğinde olan aljinat matrisin içine kapsüllenmiştir. Sterilizasyon işlemi görmüş olan veya sterilize

edilmemiş olan toprağa tohum ile nematod içeren bir kapsülün eklenmesiyle, nematodlar *Galleria mellonella* larvalarını enfekte etmek amacıyla kaçmışlardır. Her bir kapsüle 274 adet nematodu içeren bu kapsüllerdeki tohumların sterilizayon işlemi görmemiş toprağa ekiminden 1 hafta sonrasında *G. mellonella* larvalarının ölüm oranlarının %90 seviyesinde olduğu saptanmıştır. *G. mellonella* larvalarının ölüm oranlarının ekiminden sonra 2,4 ve 8 hafta süreci sona sırasıyla 27%, 23% ve 0% olduğu gözlemlenmiştir. Sterilizasyon işlemi görmüş olan topraktaki *G. mellonella* larvalarının ölüm oranı %96 olarak saptanmış ve 1 hafta süre içerisinde sterilizasyon işlemi görmemiş olan topraklardan belirgin bir farklılık göstermezken, sterilizasyon işlemi uygulanmış olan topraktaki *G. mellonella* ölüm oranı ise, 2 haftada (%81) ve 4 haftada (%51) sterilizasyon işlemi uygulanmamış olan topraktaki oranlardan belirgin şekilde yüksek rakamlarda seyrettiği saptanmıştır. Yalnızca EPN' lerde bulunan kapsüller uygulandığında, *G. mellonella* larvaları mortalitesinde gözlemlenen ekimden 1 hafta sonrasında steril olan toprakta %71 oranında ve ekimden de 2, 4 ve 8 hafta sonrasında ardı ardına %58, %33 ve %12 oranında olarak saptanmıştır. Sterilizasyon işlemi gerçekleştirilmemiş olan toprakta, yalnızca kapsüllenmiş olan nematodların uygulandığında *G. mellonella* larvalarının oranı 1,2,4 ve 8 hafta sonrasında ardı ardına %8, %30, %21, %28 oranları olarak saptanmıştır.

Shapiro-Ilan ve ark. (2005), yeni bulunmuş olan EPN ırkı *H. mexicana* (MX4)' nın potansiyelini incelemek sebebiyle farklı EPN türlerinde etkinlik ve çevre koşullarına toleranslılık, konakçı arama yeteneklerinin karşılaştırmalı açısından deneme yapmışlardır.

İmren ve ark. (2014), Yerel buğday ıslahı programlarında araştırılmakta olan kist nematoduna karşılık olarak dayanıklı hat, dayanıklı çeşitlerin geliştirilebilmesi açısından öncelikle dayanıklılık genlerinin bu ülkedeki kist nematodunun türlerine ayrıca popülasyonlarına yönelik etkinliklerinin incelenmesi gerekmektedir. Cre genlerinin bu etkinlikleri incelenen kist nematodlarının türüne, patotipine göre bazı değişkenlikler gösterebilmektedirler. Bu çalışmalar doğrultusunda dayanıklılık geni olarak belirtilen Cre1'in ülkemizde tahıl kist nematodu türlerine, patotiplerine yönelik

etkinliklerinin benzer olmadığı çoğunlukla nematoda istinaden yüksek etkinlik gösterdiği gözlenmektedir.

Alabouıd ve ark. (2019), *Galleria mellonella*' nın üretimi sonucu elde edilen kültürlerinin sürekliliğiyle *M. pardalina* ile EPN' lerin bir etkinlik denemelerinde uygulamak için belirli sayıdaki EPN larvalarını kitle üretim ile elde edilmiştir. Bu etkinlik denemeleri için çapı 2 cm ve 12 kuyucuklu olan plakalarda 2 tekerrürlü olacak şekilde yürütülmüştür. Platelerdeki her yuva (2x2 cm) 4 cm^3 %10 nemli olan steril kumlar ile doldurulmuştur. Tüm kuyucuklara birer *M. pardalina* pupası eklenmiştir. Ardından tüm kuyucuklardaki pupaların üstüne *G. mellonella* larvaları ile elde edilmiş maksimum 2-3 günlük olan EPN infektif juvenilleri 50 ve 100 IJs/pupa dozunda 100 µl saf suyla birlikte uygulanmıştır. *M. pardalina* pupaları bulunan kontrol kuyucuklarına da yalnızca 100 µl saf su eklenmiştir, EPN konulmamıştır. EPN uygulamasının ardından kuyucuklu plate' lerin kapakları içerisindeki nemin korunması için kapatılmıştır. 25±1°C' deki iklim odalarında ve karanlıkta hareketsiz olarak, yatay bir şekilde saklanmıştır. EPN uygulamalarının ardından platelerde bulunan *M. Pardalina*' nın pupaları bir binoküler mikroskop (Leica DM 1000) ile 7. Günün ardından birer birer incelenmiştir. Yapılan bu kontrollerin ardından *M. Pardalina*' nın pupaları üzerinden EPN çıkışı olup olmadığı gözlemlenmiş ve çıkış olanlar kaydedilmiştir. White trap metodunda EPN' nin gelişmesi ile çıkışının gözlenmesi sonucu *M. pardalina* pupalarının ölü şeklinde belirtilmiştir. White trap metodu ile EPN' lerin gelişmesi ya da EPN' lerin çıkışı gözlemlenemeyen *M. pardalina* pupaları ise ölü şeklinde değerlendirmeye alınmamıştır. Bu pupalar üzerinden elde edilmiş olan nematodların teyit edilmesi için bireyler bir daha *G. mellonella* larvalarının üzerine uygulanarak EPN oldukları veya olmadıklarını doğrulanmıştır. Elde edilen ve çalışmada aktif kullanılan EPN türlerinden olan özellikle de *H. bacteriophora*' nın etkisi Tephritidae familyasına ait türlerde etkili olduğu saptanmıştır.

Gözel ve ark. (2020), süne erginlerinde EPN' lerin etkinliğinin incelenmesi esaslı bir araştırmadır. Bu etkinliklerin saptanması için kurulan denemeler 12 kuyucuklu plakalarda laboratuvar şartlarında oluşturulmuştur. Filtre kâğıdı kullanılarak platelerin tabanına konulup her bir kuyucuğa bir adet süne gelecek şekilde hazırlanmıştır.

Ardından 500 ve 1000 IJs/ergin dozunda EPN 300 µl saf suya uygulanmıştır. Araştırmanın kontrol grubuna ise her ergin için yalnızca 300 µl saf su mikropipet yardımı ile eklenip, EPN eklenmemiştir. Uygulamaların ardından hazırlanan bu plateler aydınlatmasız inkübatörde 25 ºC' de saklanmıştır. Ölümlerin oranlarının hesaplanması için de 3., 5., ve 7. günler olmak üzere eklenmiş olan Süneler kontrole tabi tutulmuşlardır. Ergin bireylerdeki görülen ölümlerin EPN kaynaklı olduğundan emin olmak için White trap' lere alınmıştır (White 1927). Bu kontroller sonucu EPN çıkışı olan erginlerin kaydı tutulmuştur. Bu bireyler ölü şeklinde değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakılarak çıkışı izlenmiş olan erginlerin ölüm sebeplerinin EPN kaynaklı olduğu kesinleştirilerek doğrulanmıştır.

Sonuçlara ayrıntılı olarak bakıldığında 7. günde 500 IJs uygulanan *S. feltiae* ve *H. bacteriophora*' nın arasında rakamsal veri bakımından belirgin fark saptanamamıştır. *S. carpocapsae* türü ile diğer türlerden ise farklı olarak bulunmuştur. Diğer uygulamada ise 1000 IJ dozu uygulanan türlerin arasında da istatistiksel bir fark saptanamamıştır. Bu etkinlik denemeleri içerisinde EPN' ler süneleri öldürmüşlerdir. Denemelerin 7. gününün sonuna kadar olan kontrollerde ölümlerde artış gözlenmiştir. Bu çalışmada kontrol grubunda süne sadece saf su konmuş ve sünelerin üzerindeki doğal ölüm oranı %2-6 olduğu saptanmıştır. Canhilal ve ark. (2007) *E. integriceps*' in erginlerine bazı EPN türlerinin duyarlılığının araştırılmasına yönelik çalışmanın kontrolü de %2,5-5 ölüm oranı saptanmıştır. *Eurygaster maura* L. (Heteroptera: Scutelleridae) erginlerine iki farklı EPN türü ve üç ırkın [*S. carpocapsae* (Anamur ırkı) ve *H. bacteriophora* (Tur-H1 ve TurH2 ırkları)] da etkinliklerinin incelendiği bu çalışmadaki ölüm oranları ise *S. carpocapsae,* Tur-H1 ve Tur-H2'nin sırasıyla %55, %69, %95'tir. Çalışma içerisinde *H. bacteriophora*' nın iki ayrı ırkının benzer olmayan sonuçlar verdiği görülmüştür. (Kepenekci 2004). Yakın veriler elde edilmiş bu çalışmada *H. bacteriophora* ile *E. integriceps* erginleri üzerinde yüksek oranda ölümlere neden olduğu izlenmiştir.

Gözel ve ark. (2020), EPN' lerin *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae) olgun larvaları üzerindeki etkinlikleri araştırılmıştır. Bu araştırmada *S. feltiae* Filipjev, *S. carpocapsae* Weiser ve *Steinernema affine* Bovien, *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar seçilmiş olan EPN' ler uygulanmıştır. Etkinlik için kurulan

denemeler 9 cm çapında plastik olan petriler ile50 infektif larva (IJ)/larva olarak 25 ºC sıcaklıkta tutulmuştur. Bu deneme kontrolleri ise 24, 48, 72 ve 96 saatlerle yapılmıştır. Çalışmada izlenen metot; Patates güvesinin olgun larvalarına karşı 4 ayrı EPN türünün etkinliklerinin incelendiği bu çalışmada laboratuvar şartlarında, 9 cm çapındaki plastik Petri kaplarında yürütülmüştür. Petrilerin zeminine filtre kâğıdı ile birlikte yüzeyine larvaların besin ihtiyacına yönelik ise 8 cm^3 hacminde patates parçaları eklenmiştir. Bu petrilere son dönem olan 10 tane *P. operculella* larvası eklenmiş ve beslenmeleri sağlanmıştır. Tüm petrilere her biri için 1000 µl olacak şekilde saf su ile 50 IJ/larva dozunda EPN uygulanmıştır. Deneme kontrolü için 24, 48, 72 ve 96 saatlerde bakılmış ve larvalarda gözlemlenen ölümlerin kaynağının EPN olduğunu kesinleştirebilmek adına White trap' lere alınmıştır (White 1927). Bu kontroller sonucu EPN çıkışı olan erginlerin kaydı tutulmuştur ve bu bireyler ölü şeklinde değerlendirilmiştir. Sonuçlara bakılarak çıkışı izlenmiş olan erginlerin ölüm sebeplerinin EPN kaynaklı olduğu kesinleştirilerek doğrulanmıştır. Ölüm oranlarına bakıldığında EPN' lerin uygulanmalarından sonra 1. günden itibaren 4. güne kadar olan sürede sırasıyla %40 - %66,6, %83,3 - 100, %93,3 - %100 ve %96,6 - %100 oranlarında değişmiştir. *Steinernema feltiae* uygulamalarının ardından 2. gün larvalarda %100 oranda ölüm gözlenmiştir. Bu deneme içerisinde uygulanan bütün EPN' leri zamana göre *P. operculella* larvaları üzerinde çok yüksek bir ölüm oranı elde ettiği saptanmıştır.

Gilmore ve Potter (1993), *Sinella caeca* ve *Folsomia candida* türlerinde olan collembolalar ile Steinernema cinsinden üç ayrı EPN türünün tüketme kapasiteleri ve tüketimin ardından nematodların da *Galleria mellonella* ve *Popilla japonica* türleri üzerindeki etkinlikleri açısından bakıldığında etkinliğin azalmasına yönelik araştırma yapılmıştır. Bu çalışma ışığında iki ayrı türün de belirtilen nematodları belirgin bir ölçüde tükettikleri saptanmıştır. Collembola ve nematodlar arasında foretik ilişki saptanmamıştır.

Aşıcı (2010), 6 gün boyunca seyredilen S. curviseta' nın *S. carpocapsae* IJ' leri ile beslenerek tüketme sayısına ve oranı incelendiğinde, hazırlanan kontrol gruplarında bulunan IJ sayısı 167' dir, bir diğer ortamda ise collembolaların aktif olduğu ortamdır ve buradaki IJ sayısı yaklaşık 17 olarak hesaplanmıştır. Dolayısıyla Sinella' ların S.

carpocapsae IJ' lerini 6 günlük bir süreçte yüksek oranda bir etkinlik ile tükettiği gözlemlenmiştir. *S. polyphyllae* türündeki akarlar ile *Folsomia candida* ve *Sinella curviseta* türü olan collembolalarında EPN' lerin IJ' lerinin tüketim etkinliklerinin saptanması için bu konuda çalışmalar yapılmıştır. Bu çalışmalar neticesinde *S. polyphyllae*' nın IJ' ler üzerinde ciddi oranda etkin bir avcı olmadığını ve ayrıca bu iki collembola türünün de IJ' leri yüksek bir oranda tükettiğini kanıtlamıştır.

Gözel ve ark. (2019), Topraktan elde edilmiş olan EPN laboratuvar ortamında *Cydia pomonella* üzerindeki etkinlikleri incelenmiştir. Dört ayrı sıcaklık değeri (10, 15, 20 ve 25 ºC) ile yine üç ayrı uygulama yoğunluğunun (100, 200 ve 400 IJs/larva) uygulandığı bu çalışma planı 12 tekerrür şekilinde yapılmıştır. Bu çalışmalar 7. günün ardından bitirilmiştir. *H. bacteriophora* ve *S. feltiae* izolatlarıyla yapılan bu çalışmalarda 10 ºC' de, *C. Pomonella*' nın larvalarındaki gözlemlenen ölüm oranı doğrudan uygulama yoğunluğunun yükselmesi ile bu oranda yükselmiştir. Fakat düşük olan sıcaklıklarda ise *S. feltiae*'nin *C. pomonella* larvalarında gözlemlenen ölüm oranı *H. bacteriophora*' ya göre daha fazla olduğu saptanmıştır. Çanakkale ili ve civarlarındaki elma bahçelerinden alınan toprak numunelerinde gözlemlenen EPN' lerin, *C. pomonella* larvaları üzerinde olan etkinliklerinin incelendiği bu çalışmada *S. feltiae* ve *H. bacteriophora* izolatlarının elma iç kurdu larvaları üzerindeki ölüm oranları kendi aralarında farklı sonuçlar göstermiştir. Neticesinde sıcaklık yükseltildiğinde, uygulanan iki türün de *C. pomonella* larvalarında gözlemlenen ölüm oranını etkilediği hatta arttırdığı saptanmıştır.

Gürel ve Gözel (2017), konakçı olarak Fındık kurdu larvaları kullanarak hazırlanan ve EPN' lerin etkinliğini larvalar üzerinde incelemek amacıyla Blum ve ark. (2009)' yla doğal yaşamda yürütülen bu araştırmada toprak içerisine *H. bacteriophora*' nın belirlenen 250.000 infektif larva/m² dozunda ve iki defa uygulanmıştır. Bu araştırma sonucunda fındık kurdu larvalarında gözlenmiş olan %72 ölüm oranı *H. Bacteriophora*' nın etkinliğinin ne kadar yüksek değerde olduğunu belirtmektedir. Fındık kurdu ile mücadelede kullanılan EPN' lerden *H. bacteriophora*' nın bu bahçelerde de kolaylıkla uygulanabileceğini belirtmişlerdir. EPN' lerin fındık kurdunda etkinliğini toprak içerisinde incelemek için Peters ve ark. (2007), *S. feltiae, H. indica* ve *H. bacteriophora* olacak şekilde 3 ayrı türü denemişlerdir. Fındık bahçelerinde yapılan 2,2 milyon/ m²

EPN uygulamasında topraktaki *S. feltiae, H. indica* ve *H. bacteriophora*' nın fındık kurdu içerisinde oluşturduğu ölüm oranlarının verileri sırasıyla %41, %65 ve %75 olarak saptanmıştır. *H. bacteriophora*' nın iyi oranda dayanıklılık, etkinlik sergilemesinden kaynaklı fındık kurdu kontrolü kapsamında en başarılı ve umut verici olarak belirlendiği kanısına varmışlardır. Diğer çalışmalarda *H. bacteriophora*'nın *C. nucum* larvalarının üzerindeki gözlemlenen etkinliğinin diğer bazı türlere karşı daha yüksek belirlenmesi laboratuvarda yürütülen fındık kurdu üzerindeki çalışılan etkinlik denemelerinde de bulunan sonuçlara benzer olduğu gözlemlenmiştir. Bu veriler *C. nucum*' un larvalarına göre EPN' lerin etkinlik çalışmalarında *H. bacteriophora*' nın belirlenen en etkili tür olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Kongu (2012), Bu çalışmada hibridizasyonun ardından elde edilmiş olan toplamda 10 ırkın %70' inin etkinlikleri ebeveynleri ile karşılaştırıldığında daha fazla olduğu görülmüştür. Bu sonuca yönelik Mukuka ve ark. (2010b) tarafından yapılan bir araştırma ile de yakınlık seyretmiştir. Ek olarak etkinlik üzerine yapılan bu çalışmada ebeveyn olarak kullanılmış olan erkek ve dişi olan bireyler birbirinden farklı şekilde etkiler sergilemişlerdir. Yüksek oranda etkinlik verilerine sahip olan bu hibrit ırkların %57,1 oranında etkinlik verilerinin dişi olan bireylerin etkisi sonucu artış gösterdiği, %42,9' unda ise erkek olan bireylerin etkisi sonucunda kaldığı saptanmıştır. Tüm ebeveynler ve bu ebeveynlerin hibritlenmesi ile oluşan hibrit ırkların her farklı uygulama dozlarına da birbirinden farklı tepkiler sergilediği gözlemlenmiştir. Bu uygulama dozu ile paralel olacak şekilde etkinlik verilerinin de yükseldiği gözlemlenmiştir. En düşük olan uygulama dozunda (5 IJ/larva) ise en yüksek olan etkinlik değerine ulaşan ebeveyn ırk %60 oranla H.b. 876 (Çanakkale) olarak belirlenmiştir. Ayrıca en yüksek etkinlik değerine ulaşan diğer bir hibrit ırksa %83,33 oranla H.b. E (H.b. 6 ♀ x H.b. HIZ ♂) olarak belirlenmiştir. Ardından tekrar aynı oranda uygulama dozuna bakıldığında en düşük olan etkinlik değerine ulaşan ebeveyn ve hibrit ırklar ise belirtilen sırasıyla %13,33 oranla H.b. 17 (Kırklareli) ve %26,67 oranla H.b. B (H.b. 1138 ♂ x H.b. 876 ♀) belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara bakıldığında bu çalışmada EPN' ler *in vitro* yöntemi ile üretilmiş ve hibridizasyon yöntemiyle ebeveynlerine kıyasla daha fazla üstün etkinlik verilerine ulaşan ırkların elde edilmesi ile sağlanmıştır.

Hürkan ve ark. (2019), EPN izolatları olan *Steinernema affine* (46), *Steinernema feltiae* (96) türlerinin Zeytin fidan tırtılı *Palpita unionalis* (Hübner) son evre larvalarındaki etkinlikleri laboratuvar ortamı veya saksı koşullarında incelenmiştir. Laboratuvar ortamında EPN' lerin etkinliklerine bakılması için 12' li plateler kullanılarak 2 ayrı uygulama dozu (25 IJ/larva ve 50 IJ/larva) kullanılır ve sıcaklık olarak 25 ºC' de ortam koşulları belirlenmiştir. Platelerin alt tabanına Whatman kâğıdı konularak her yuvaya 1 tane son evre olan *P. unionalis* larvası eklenir ardından farklı yoğunluktaki IJ dozları (25, 50 IJ/larva) *S. affine* 46 ve *S. feltiae* 96 izolatları üzerlerine bırakılmıştır. Bu ekleme işleminin ardından 1, 3, 5, 7 ve 9. günlerde EPN çıkışları gözlemlenmiştir. Diğer uygulama yöntemi olarak belirtilen saksı denemesinde her saksıya tam 10 adet *P. unionalis* larvası konulmaktadır, tek bir uygulama dozu bulunmakta (40.000 IJ/saksı) ve sıcaklık değeri 25 ºC' de ortam hazırlanmıştır. EPN'ler tarafından enfekte edilmiş olan son dönem *P. unionalis* larvalarında saptanan ölüm oranlarına bakıldığında nematodun türüne ve uygulama dozuna göre değişkenlik göstermekle birlikte 25 IJ' de, *S. affine* ve *S. feltiae* için sırası ile %91, %6, %83,3 elde edilmiş veriler hesaplanmıştır. Bu 50 IJ' de ise, %100, %91,6 oranlarında hesaplanmıştır. Saksı denemesinde saptanan ölüm oranlarında sırasıyla %50 ve %90 oranlarında hesaplanmıştır. Ardından elde edilen sonuçlara bakıldığında laboratuvar ve saksı denemesinde de EPN' lerin bu zararlıyı enfekte etme oranının önemli ölçüde yüksek seviyeleri bulduğu saptanmıştır. Uygulamanın ardında 7. günde bu larvalardaki hesaplanan ölüm oranlarını belirtmişlerdir. *P. brassicae* larvalarında belirlenen en yüksek oranda ölüm oranı (%84,3) 25 ºC sıcaklık koşullarında *S. feltiae* (izolat 97-Bursa) olarak saptanmıştır.

Odendaal ve ark. (2016), 3 ticari olarak EPN türünü (*S. feltiae* ve *H. bacteriophora* Hb1 ve Hb2) ve 2 yerel EPN türünü (*S. jeffreyense* ve *S. yirgalemense*), elma iç kurdu *Cydia pomonella*' ya karşı kullanarak teste tabi tutmuşturlar. Tarla denemelerini spreyleme olacak şekilde yapmıştırlar. Bunun sonucunda da en etkili olan tür *S. jeffreyense* (%67) olarak belirlenmiştir. Daha sonra ise *H. bacteriophora* Hb1 (%42) ve *S. yirgalamense* (%41)'nin sırası ile geldiğini belirtmişlerdir.

2.2 Üreme Potansiyeli Kaynak Araştırması

Chkhubianishvili ve ark. (2007), yürüttükleri benzer bir çalışmada *S. feltiae* ve *H. bacteriophora*' nın *H. cunea*' ya karşı etkinliğini araştırmışlar ve ölüm oranlarını sırası ile %96 ve 93 olarak belirtmişlerdir. Mikaia (2008)' daki çalışmasında *G. mellonella, H. cunea* ve *Leptinotarsa decemlineata* Say. (Coleoptera: Chrysomelidae) larvaları ile *S. feltiae*' nin üreme potansiyelini incelemiştir. *Steinernema feltiae*enfeksiyonun ardından, larvalardaki üreme potansiyeli oranını hesaplamak için 7. günün ardından *L. decemlineata*, *H. cunea* ve *G. mellonella*' da sırayla %98,4, %94,5 ve %91,8 oranlarında verilere ulaşmıştır. Bu sonuçlara yönelik *S. feltiae*' nin tarımsal zararlılar için uygulanma potansiyelinin yüksek olduğu saptanmıştır. (Yamanaka ve ark. 1986, Gorgadze ve ark. 2013).

Ünlü ve Özer (2003), üreme potansiyeli ve iki EPN arasındaki rekabetin değerlendirilmesi, *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida: Steinernematidae) ve *Heterorhabditis bacteriophora*, Poinar 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae. *Steinernema feltiae* ve *Heterorhabditis bacteriophora* ile enfekte edilmiş *Galleria mellonella* (L.) larvasında meydana gelişi, ilk nematoda maruz bırakılmanın 9. gününde ve en sonuncu nematoda maruz kalmanın 6. gününde (25 ± 0,5 °C) başlamıştır. Her larvada oluşan yaklaşık nematod sayısı 13,829 bulunmuştur. Aralık, *S. keçeiae* enfeksiyon denemeleri için izlenen değerler ise 4365 ile 27.510 civarlarında olduğu gözlemlenmiştir. Larva başına ortalama nematod sayısı 141,562 olarak hesaplanmıştır. Bu aralık ayında ise, *H. bacteriophora* enfeksiyon denemesi incelendiğinde rakamlar 50,905- 271,593 olarak belirtilmiştir. İki ayrı tür eş zamanlı olarak aynı konağa ayrı ayrı aşılandığında, *H. bakteriophora*, *S. keçeiae*' den daha yüksek oranda ölümlere neden olmuştur.

Ulu ve ark. (2016), *Steinernema sp*. (EBN-1e) ve *H. bacteriophora* (EBN-10k) ile 11 birbirinden ayrı fungusitin etkisi laboratuvar şartlarında belirlenmiştir. Yapılan bazı testlerin sonucunda belirlenen deneme gruplarında Steinernema ırkının Heterorhabditis ırkından çok daha dayanıklı olduğu saptanmıştır. IJ' leri canlılık oranı EBN-1e nematod ırkı ile yapılan çalışmada Chlorfluazuron uygulamasında %5' in altına düşerken;

Captan, Diafenthiuron, Trimiltox forte, Methomyl, Benomyl ve Mancozeb uygulama gruplarında izlendiğinde IJ' lerin canlılığı %90' dan fazla olduğu saptanmıştır. Bunların sonucunda, *H. bacteriophora* (EBN10k) ırkının canlılık oranı *Steinernema* sp. (EBN-1e)' nin canlılık oranından daha az olduğu gözlemlenmiştir. Birbirinden farklı fungusitlerin uygulamalarında kullanılan EBN-1e ırkının, EBN-10k ırkından daha yüksek üreme potansiyelinde olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma sonucunda 2 ayrı ırk arasındaki konsantrasyonlarda (500 IJs ve 1000 IJs), farklı kimyasallara maruz kalma veya maruz bırakma süreleri (48 ve 96 saat) ile üreme oranları açısından önemli bir fark saptanamamıştır (Atwa ve ark. 2013).

3.MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Laboratuvarda *Galleria mellonella* Larvalarının Üretimi

Bu tez kapsamında canlı materyal ve test böceği olarak *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae)' nın 4. dönem larvaları kullanılmıştır. Bunların halk dilindeki isimleri petek güvesi veya balmumu güvesi olarak bilinmektedirler. EPN' lere karşı hassasiyetleri açısından en uygun konukçu olarak tespit edilmiştir. (Bedding ve Akhurst 1975).

Bu test böceği 30-32 ℃' de sabitlenmiş ayarlı inkübatöre yerleştirilen cam kavanozlar ile yetiştirilmektedirler. Cam kavanozun üzeri gözenek çapı 2 mm olan sık gözenekli teller ile kaplanıp kelepçe ile sıkıştırılmıştır. Cam kavanoz içerisine petek güvesi yumurtaları ile bu larva besini birlikte konulmaktadır. Larva besini içeriği için bal, gliserin, kepek, mısır unu, soya unu, bal, gliserin, kepek, süt tozu ve maya karışımı kullanılmıştır (Kaya ve Stock 1997). Ayrıntılı besin içeriği aşağıdaki tabloda gösterilmektedir. (Çizelge 3.1.) Besin içerisine konan yumurtaların açılması ile başlayarak 4. dönem larva evresine gelmesi yaklaşık 4 hafta sonunda gözlenmektedir. Son dönem larva halini aldıklarında larvalar besin ortamından ayıklanıp EPN' lerin üreme ve etkinliklerinin araştırılmasında kullanılmıştır. Bu üretim sirkülasyonunun devamlılığını sağlamak için bir miktar larva ayrılarak pupa oluşumu ardından ergin birey oluşumu ve sonrasında yumurta bırakılması sağlanarak hazırlanan tellerin üzerine kâğıt konularak erginin bıraktığı yumurtalar toplanır. Toplanan yumurtalar ayrı bir besin kavanozuna alınarak üretimin devamlılığı elde edilmektedir.

Çizelge 3. 1. *Galleria mellonella* Besininin İçeriği

Bal	%20
Gliserin	%20
Kepek	%20
Mısır Unu	%15
Soya Unu	%10
Süt Tozu	%10
Maya	%5

3.2. Yem hazırlanışı

Öncelikle kepek, mısır unu, soya unu ve süt tozu karıştırma kabı içerisinde karıştırılmıştır. Bal ve gliserin önceden ısıtılmış hot-plate (ısıtıcı 200 ℃) kullanılarak tencerede kaynatılmıştır. Kaynama esnasında üzerine maya eklenmiştir. Maya eritilmiştir. Köpürdükten sonra diğer mazlemeler tencereye eklenmiştir. Bu malzemeler yavaşça eklenmiştir. Homojenite sağlanması için karıştırılmıştır. Ardından hazırlanan yem soğutulmaya bırakılmıştır.



Şekil 3. 1. Etüv ile ortam şartları korunarak besin içerisinde yetiştirilen *Galleria mellonella* larvaları



Şekil 3. 2. Farklı *Galleria mellonella* dönemlerinin inkübatör içerisindeki bulunduğu kavanozlar



Şekil 3. 3. Olgun larva ayıklama işlemi için kavanozdaki karışımın çıkarılması işlemi



Şekil 3. 4. Etüv ile ortam şartları korunarak besin içerisinde yetiştirilen *Galleria mellonella* larvaları görünümü



Şekil 3. 5. Yem içerisine eklenen larvaların görüntüleri

3.3. Çalışmada Kullanılan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkı

Bursa Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Nematoloji laboratuvarında üretilmiş ve patenti alınmış üstün ırk olan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı bu tez çalışmasında kullanılmıştır.

Heterorhabditis bacteriophora HBH ırkı nematod Kaya ve Stock (1997)' un laboratuvar ortamında *in vivo* üretim koşullarına uygun olacak şekilde yapılmıştır. *Galleria mellonella* üzerinde üretilmiş HbH ırkı IJ bireyler +4 ºC' de olacak şekilde buzdolabındaki kültür kaplarında saklanmaktadırlar. Bulaşıklık ya da saprofit mikroorganizma üremelerine engel olabilmek için kültürler Ringer solüsyonu içerisinde saklanmıştır. (Ringer1882).

Ringer Solüsyonu İçeriği

Çizelge 3. 2. Ringer Solüsyonu İçeriği

Kimyasal Madde Adı	Miktar(g)
NaCl	9.00
KCl	0.42
$CaCl_2x2H_2O$	0.37
$NaHCO_3$	0.20
Saf su	1000

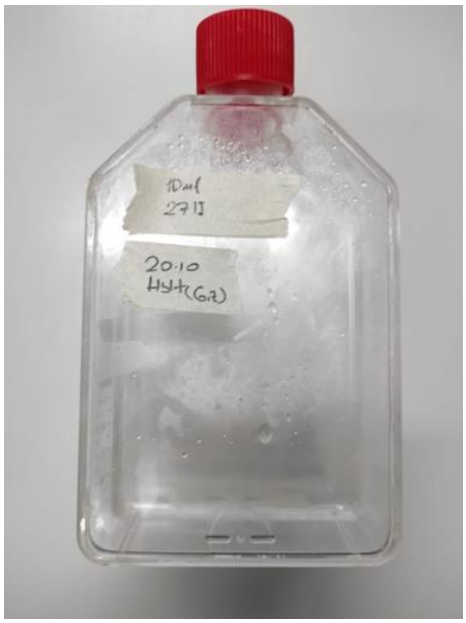


Şekil 3. 6. +4C' de muhafaza edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH kültürleri



Şekil 3. 7. +4C' de muhafaza edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH kültürleri

HBH ırkı EPN' lerin etkinlik denemelerinde her bir larvaya uygulanacak IJ birey sayısı önem teşkil etmektedir. Dolayısıyla kültür kaplarındaki toplam IJ sayısının belirlenmesi ve ardından doz hesaplaması yapılmıştır. Doz hesaplama işleminde kültür kaplarından 10' ar µl sıvı mikropipet yardımıyla çekilmiştir. Sayım kabına konulmuştur. İçerisine ringer eklenerek hafifçe sallayarak gözlere nematodların yayılması sağlanmıştır. Ardından stereo mikroskop altında alınan örneğin sayımı yapılmıştır. Bu işlem beş tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır. 10 µl' deki ortalama IJ sayısı belirlendikten sonra kültür kabının üzerine not edilmiştir.



Şekil 3. 8. Doz belirleme sonrası kültür kaplarının üzerindeki bilgiler



Şekil 3. 9. EPN' lerin stok olarak muhafaza edildiği kültür kapları



Şekil 3. 10. Enfeksiyon denemelerinde kullanılan 24 kuyucuklu plate

3.4. *In vivo* EPN Üretimi

Enfeksiyon işlemi, her biri 1,5 cm çapı olan, 2 cm derinliğindeki ve toplam 24 adet kuyucuğu bulunan plateler içinde yapılmıştır. Bu amaç için ortalama 5-6 larva gerekli olup, her bir kuyucuğa 1 adet larva konulmakta ve üzeri %10 oranında steril Ringers solüsyonu ile nemlendirilmiş 3 cm^3 steril kum ile kaplanarak ardından üzerine yaklaşık 50IJ/larva dozunda IJ inoküle edilerek platelerin kapağı parafilm ile kapatılmıştır. Plateler 25°C' de 4 gün inkübasyona bırakılmıştır. Dört gün sonunda plateler açılarak larvalar steril Ringer solüsyonu ile yıkanmakta, ardından White trap düzeneğine alınmıştır. White trap düzeneği için çapı 6 ve 9 cm olan petriler kullanılmıştır. Her 9 cm çaplı petrinin içerisine üzeri filtre kâğıdı ile kaplanmış 6 cm çaplı petri kapağı yerleştirilmiştir, 6 cm çaplı petri kapaklarının üzerine de 15 ml steril Ringer solüsyonu eklenerek kapakları kapatılmıştır. 14 gün sonunda da enfekteli larvalardan çıkış yapıp steril Ringer solüsyonu içerisinde biriken yeni nesil IJ' ler pastör pipeti yardımıyla 200ml' lik flasklara alınmıştır. Denemelerde kullanılmak üzere 4-8 ºC' de buzdolabında stoklanmıştır.



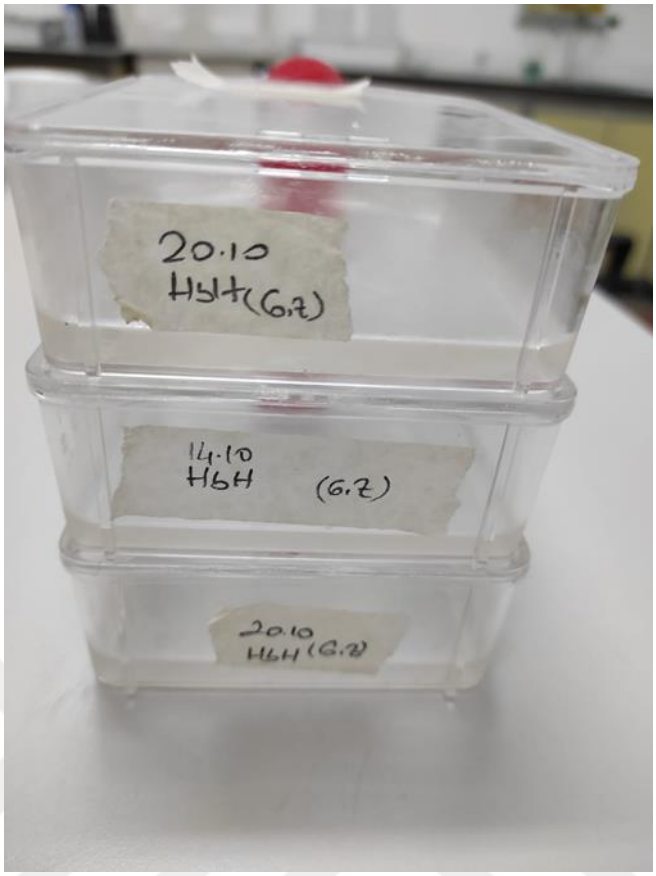
Şekil 3. 11. Toprakta yapılan enfeksiyon denemesi



Şekil 3. 12. Toprakta yapılan enfeksiyon denemesi



Şekil 3. 13. Üzerine IJ bırakılmış parafilm ile kapatılmış toprak enfeksiyon denemesi



Şekil 3. 14. Kültüre alınmış *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı yeni bireyleri

,

3.5. *In vitro* EPN Üretim Aşamaları

3.5.1. Simbiyont Bakteri İzolasyonu

Bakteri izolasyonu işleminde, 5 adet *G. mellonella*' nın son dönem larvası EPN ile 100 IJ/larva dozunda inokule edilmiştir. İnokülasyon işlemi 'EPN Enfeksiyon Denemesinin Kurulması ve *In vivo* EPN Üretimi' kısmında belirtilen plateler içinde yapılmıştır. Bu amaçla, her kuyucuğa 1 adet larva konulmakta ve üzeri %10 oranında steril Ringer solüsyonu ile nemlendirilmiş 3 cm^3 steril kum ile kaplanarak üzerine belirtilen dozda IJ inoküle edilmiştir. Platelerin kapağı parafilm ile kapatılarak 25 °C' de 1 gün inkübasyona bırakılmıştır. Belirtilen süre sonunda plateler açılarak larvalar steril Ringer solüsyonu ile yıkanmakta ve ardından her bir larvanın yüzeyi %70' lik etil alkol ile 5 dk süreyle sterilize edilmiştir. Sterilizasyon işleminin ardından her bir larva ventralinden steril iğne ucu ile hafifçe delinerek larvanın vücut sıvısı (hemolimf) açığa çıkarılmıştır. Açığa çıkan hemolimf steril bir öze yardımıyla alınarak NBTA agara sürülüp 25 °C' de 3 gün inkübasyona bırakılmıştır.

3 gün sonunda koloni gelişimi görülen agar üzerindeki bakteriden steril öze ile bir ya da birkaç koloni alınmakta ve 250 ml' lik erlen içerisindeki 80ml steril YS sıvı besin ortamına aktarılmıştır. Steril YS sıvı besin ortamı 25 °C' de 200 rpm' e ayarlanmış sıcaklık kontrollü orbital çalkalayıcıya yerleştirilmekte ve karanlık ortam koşullarında 1 gün süreyle bakterilerin steril YS sıvı besin ortamında üremesi sağlanmıştır. Steril YS sıvı besin ortamında üreyen bakterilerden stok oluşturulması için 1 gün sonunda orbital çalkalayıcıdaki bakteri kültürü alınarak içerisine %15 oranında steril gliserin eklenmiştir. Karışım 1.5ml' lik eppendorf tüplerine aktarılarak daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -20 °C' de saklanmıştır.

3.5.2. NBTA Agar İçeriği

Çizelge 3. 3. NBTA Agar İçeriği

Kimyasal Madde Adı	Miktar(g)
Standard-I-Nutrient Agar	37.0
Bromthymolblue	0.025
Saf Su	1000
2,3,5-Triphenyl-tetracoliumchloride solution	4

3.5.3. YS Sıvı Besin Ortamı

Çizelge 3. 4. YS Sıvı Besin Ortamı

Kimyasal Madde Adı	Miktar(g)
Yeast extract	5.0
NaCl	5.0
$NH_4H_2PO_4$	0.5
K_2HPO_4	0.5
$MgSO_4x7H_2O$	0.2
Saf su	1000

3.5.4. WOUTS Agar İçeriği

Çizelge 3. 5. WOUTS Agar İçeriği

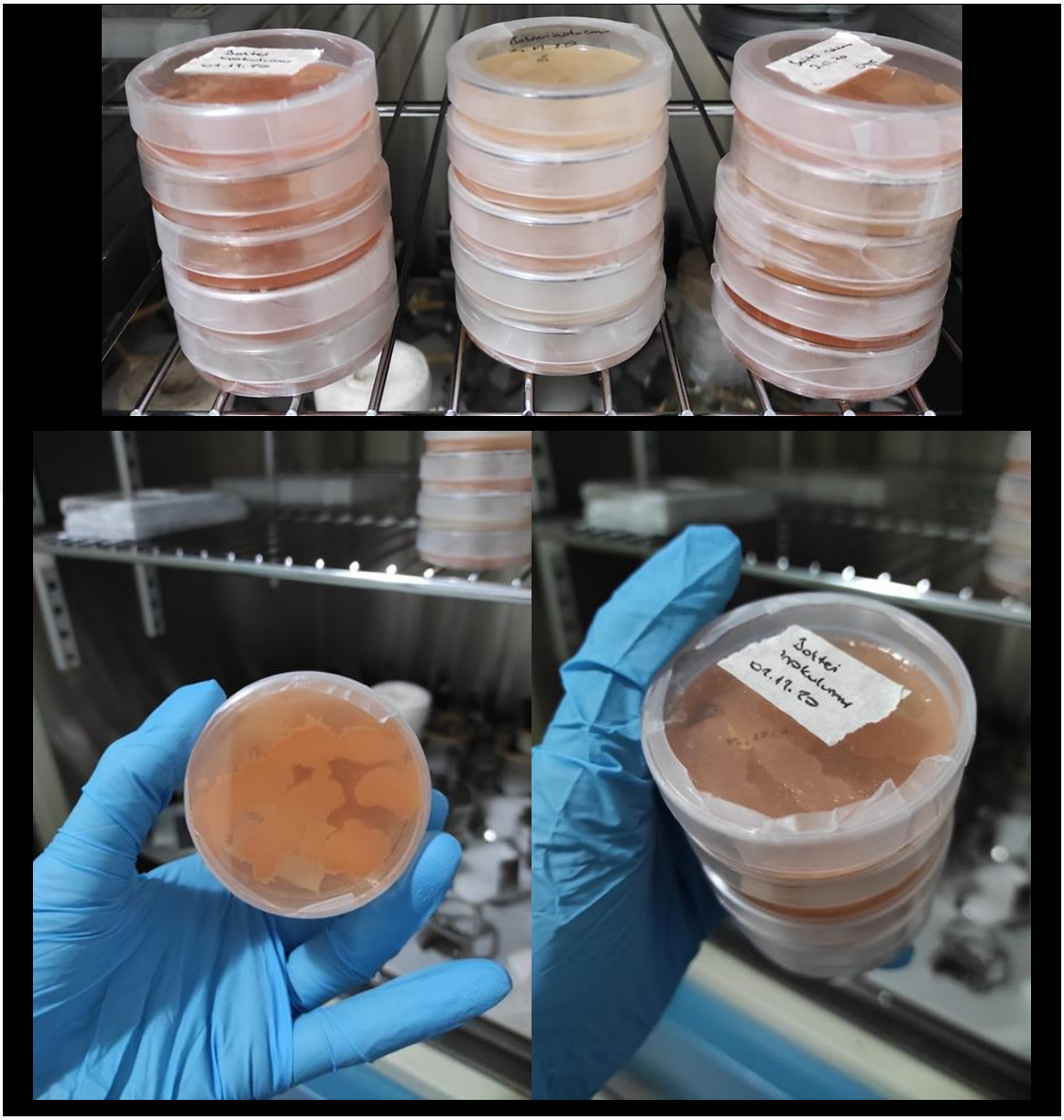
Kimyasal Madde Adı	Miktar(g)
Bacto Nutrient Broth (Difco)	16.0
Bacto Agar (Difco)	12.0
Corn oil or sunflower oil	5.0
Saf Su	1000



Şekil 3. 15. NBTA agar üzerine ekimi yapılmış olan *Photorhabdus*



Şekil 3. 16. YS sıvısı bakteri süspansiyonu



Şekil 3. 17. Bakterinin Wouts agara ekimi ve 48 saat sonrasında belirginleşen renk değişimi

3.5.5. Yumurta İzolasyonu İşlemi

Test böceği olarak kullanılan *G. mellonella*' nın olgun larvaları 50 adet IJ/larva dozunda *H. bacteriophora* ile inoküle edilmiştir. Bu işlem 25 ºC' de 4 gün boyunca inkübasyona bırakılarak enfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. 24 kuyucuklu platelerin her kuyucuğuna 1 adet *G. mellonella* larvası gelecek şekilde yerleştirilip üzerleri ringer solüsyon ile %10 oranında nemlendirilmiş olan $3cm^3$ steril kum ile kaplanmıştır. Her kuyucuğa belirlenen dozda IJ gelecek şekilde mikro pipet yardımıyla nematodlar inoküle edilmiştir. Parafilm ile kapağı kapatılmıştır.

Dört günün ardından kurulmuş olan IJ enfeksiyon denemesi kuyucuklu kapları açılmıştır. Ölü olarak elde edilen larvaların yüzeyinin topraktan arınması için steril su ile su banyosu yaptırılmıştır. Ardından içerisinde ringer solüsyonu bulunan petride disekte edilmiştirler. Yaklaşık olarak 200 adet hermafrodit birey nematod iğnesi kullanılarak içerisinde Ringer solüsyonu bulunan 6 cm' lik petrilere konulmuştur. Mikroskop yardımıyla hermafrodit bireylerin yumurtalarının döllenip döllenmediği incelenmiştir.

Elde edilen tüm hermafrodit bireyler pastör pipet ile petriden cam tüpe aktarılmıştır. Aktarılmış olan hermafrodit bireylerin üzerine 5 ml steril ringer solüsyonu eklenmiştir. Hermafrodit bireylerden yumurtaları çıkarabilmek için küçük boyutta jilet parçaları cam tüpün içerisine eklenmiştir. Bu cam tüp vorteks yardımı ile 1 dk kadar karıştırılmıştır. Hazırlanan içerik şeffaflığını kaybetmiş bir renk almıştır. Elde edilen içeriği 72 µm' lik tül ile süzülerek artıklardan arındırılmıştır. Yumurtaların bulunduğu tülün altındaki sıvı kısım başka bir tüpe alınmıştır. Bu işlem hermafrodit bireylerden gerekli yumurta elde edilene kadar tekrarlanmıştır.

Steril ringer solüsyonu içerisinde duran yumurtalar cam tüpten alınarak 1.5 ml' lik eppendorf tüplerine aktarılmıştır. 1 dk boyunca 2000 rpm' de santifrüj edilmiştir. Mikro pipet yardımıyla santifrüj sonrasında eppendorf tüplerin dibine çöken yumurtaların üzerindeki sıvı çekilmiştir. Ardından steril ringer solüsyonu eklenerek tekrar 1dk boyunca 2000 rpm' de santifrüj edilmiştir.

Bu işlem yumurtaları *G. mellonella* ve hermafrodit kalıntılarından arındırmak amacıyla 4 kez tekrarlanmıştır. Son santifrüj işleminin ardından dibe çöken yumurtaların üzerindeki sıvı, tüpten alınmıştır. Tüpteki yumurtaların üzerine yüzey sterilizasyonu sağlamak için sterilizasyon solüsyonu eklenmiştir. Hazırlanan tüpler 3 dk çalkalandıktan sonra 2 dk boyunca 3000 rpm' de santifrüj edilmiştir. Yumurtaların yüzey sterilizasyonu işleminin 7 dk' yı aşmamasına; yumurtaların sterilizasyon solüsyonuna fazla maruz bırakıldığında ölmemesi için özenle dikkat edilmiştir.

Santifrüj ardından dibe çöken tüpteki yumurtaların üzerinden sterilizasyon solüsyonu pastör pipet kullanılarak alınmıştır. Yumurtaların üzerine YS sıvı besin ortamı eklenerek 2 dk boyunca 3000 rpm' de santifrüj edilmiştir. Son santifrüj işleminden sonra yumurtalar steril kabin içerisinde 300 µl steril YS sıvı besin ortamı eklenmiş steril platelere aktarılmıştır. Parafilm ile petrilerin kapakları kapatılmıştır. 25 ºC' de 48 saat süresince inkübasyona bırakılmıştır. Beklenen süre sonucunda yumurtadan çıkan IJ' lerde bulaşma olup olmadığı gözlemlenmiştir.

Sterilizasyon Solüsyonu

Çizelge 3. 6. Sterilizasyon Solüsyonu

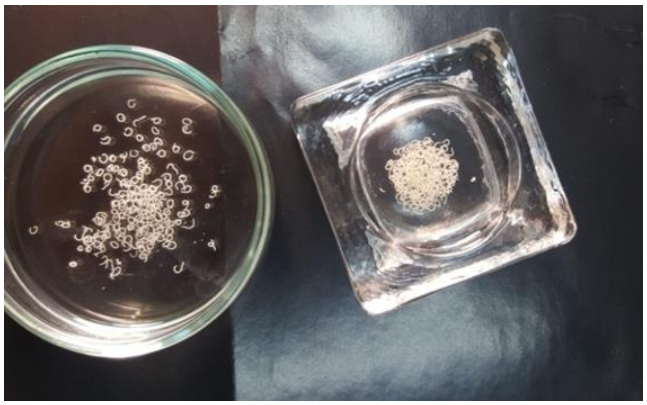
Kimyasal Madde Adı	Miktar(ml)
NaOCl	1
4MNaOH	1
Saf su	10



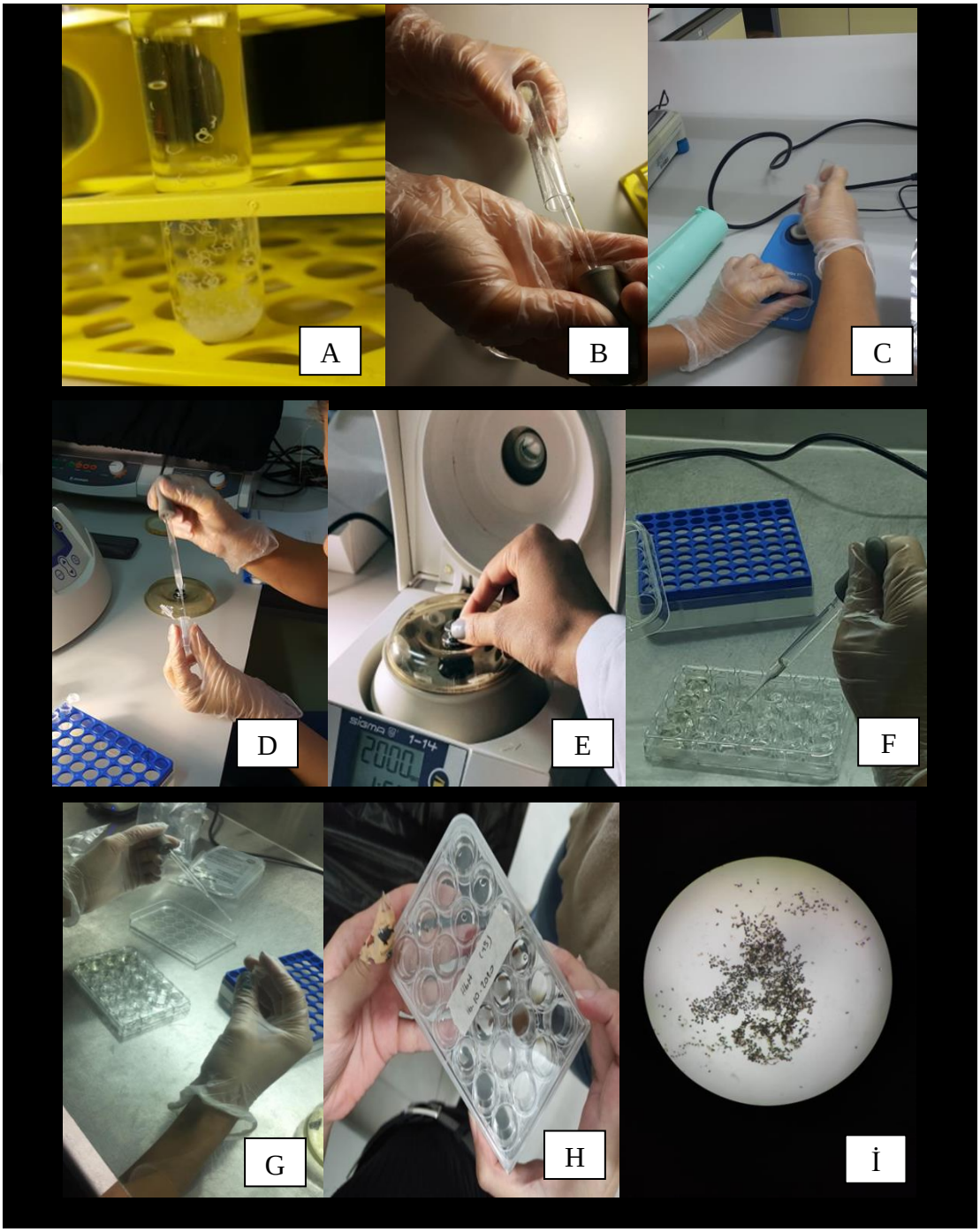
Şekil 3. 18. Enfesiyon denemesinden alınmış topraklarından arındırmak için yıkanmış enfekteli *Galleria mellonella* larvaları



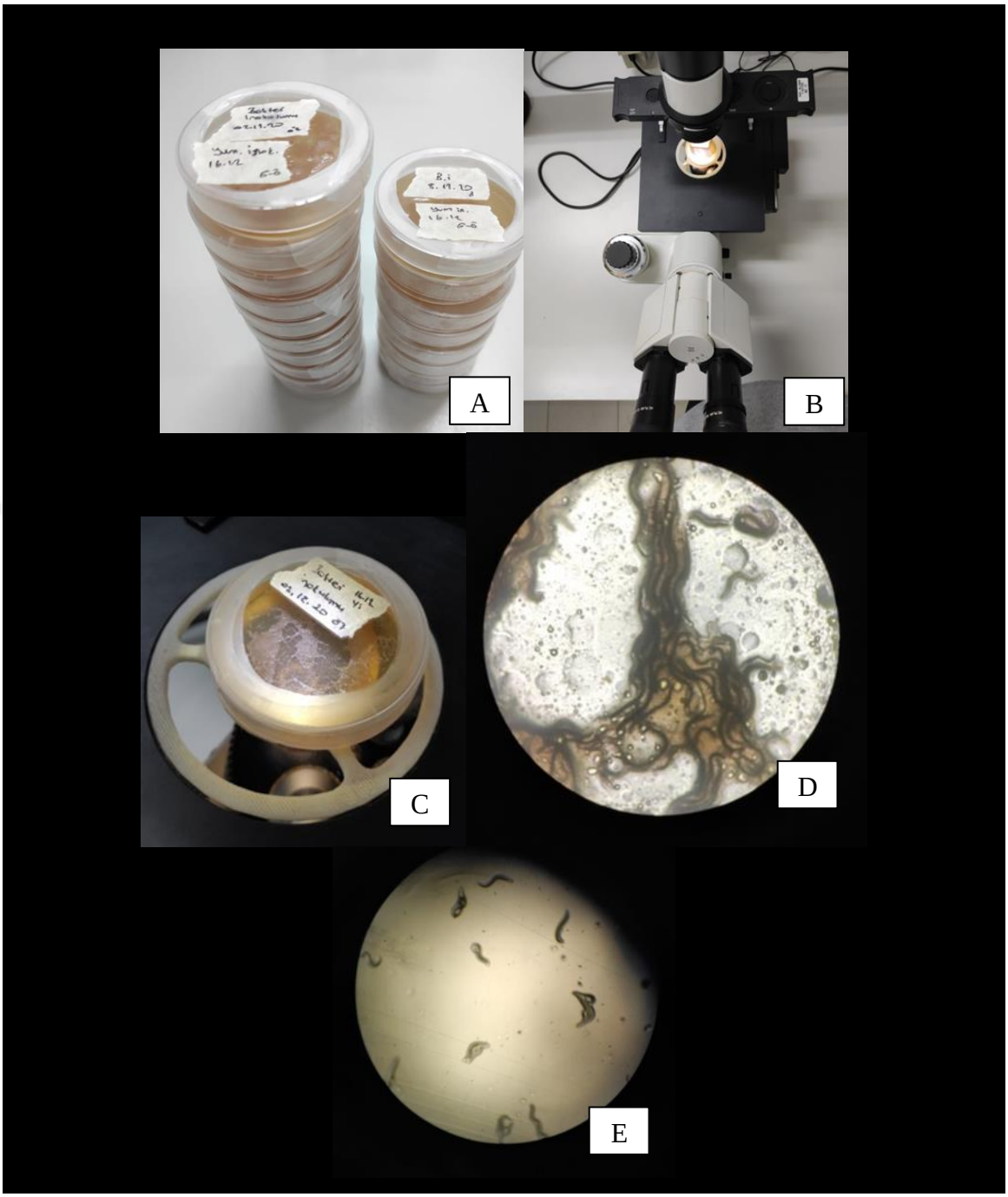
Şekil 3. 19. Disekte edilmiş olan *Galleria mellonella* larvaları



Şekil 3. 20. Disekte edilmiş olan larvadan toplanmış *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı hermafrodit bireyleri



Şekil 3. 21. Yumurta izolasyonu (A-B: Hermafrodit bireylerin yıkanması. C: Vorteks ile hermafrodit bireylerin parçalanması. D: Yumurtaların ependorf tüplere alınması. E: Santrifüj. F: YS ortamının kuyucuklara eklenmesi. G: Yumurtaların YS ortamına aktarılması. H: 24 kuyucuklu kültür kabının parafilmle kapatılması. İ: Yumurtaların mikroskobik görünümü.).



Şekil 3. 22. *In vitro* sonrası IJ çıkışları (A: Açılmaya hazır olan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH yumurtalarının, bakterili besiyerine eklenmesi. B-C: Yumurtaların mikroskopta incelenmesi. D: Agar üzerindeki *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerinin mikroskobik görüntüsü. E: IJ' lerin petri kapağındaki mikroskobik görüntüsü).

3.6. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının Üreme Potansiyeli

Denemeler 24 kuyulu (4x6) hücre kültürü kaplarında (24-Well plate – kuyu çapı 1,4 cm, kuyu hacmi 3 cm^3) kurulmuş ve üç tekerrürlü olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Her bir kuyucuğa 1 adet olgun larva konulmuştur. Üzeri otoklavda steril edilmiş %10 oranında ringer solüsyonuyla nemlendirilmiş steril kum ile kaplanmıştır. Denemelere başlamadan önce, +4 °C' de saklanan ırklar buzdolabından çıkartılarak oda sıcaklığına adapte olmaları için beklenmiştir. Ardından her bir kuyucuğa 100 adet IJ dozunda nematod bırakılabilmesi için kültür kabından 10 µl' lik sıvı mikro pipet yardımıyla sayım kabına konulmuştur. Stereo mikroskop altında sayım yapılmıştır. Her bir kuyucuğa 100 adet IJ mikro pipet yardımıyla kuyucukların üzerine bırakılmıştır. 24 kuyulu hücre kültürü kabının kapağı parafilm bant ile kapatılmıştır. 25 ℃' de etüve yerleştirilmiştir. Üreme potansiyelinin saptanması için enfekte olmuş olan *G. mellonella* kadavraları disekte edilmiştir. Hermafrodit birey sayımı yapılmıştır. Enfeksiyon denemesi 2., 3., 4., 5., 6., 7. günler olmak üzere her gün 10 adet *G. mellonella* olacak şekilde açılıp disekte edilmiştir. Diseksiyon işleminde ise sayım iğnesi, petri, cam pipet kullanılmıştır. Larvanın bir ucu cımbız ile tutularak iğne ile enfekte olmuş larvanın içi yavaşça petriye çıkartılmıştır. Üzerine ringer solüsyonu eklenerek cam pipet yardımıyla homojenize hale getirilmiştir. Ardından hazırlanan karışım içerisinden hermafrodit bireyler toplama iğnesi ile toplanmış ayrı bir kaba konularak sayım işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler 3 tekerrürlü olacak şekilde yapılmıştır. Yukarıda bahsedilen işlemler, *in vivo* ve *in vitro* üretim sonucunda elde edilen bireylerin sayımı için uygulanmıştır.



Şekil 3. 23. Enfekte olan *Galleria mellonella* larvalarının açılması (diseksiyon)



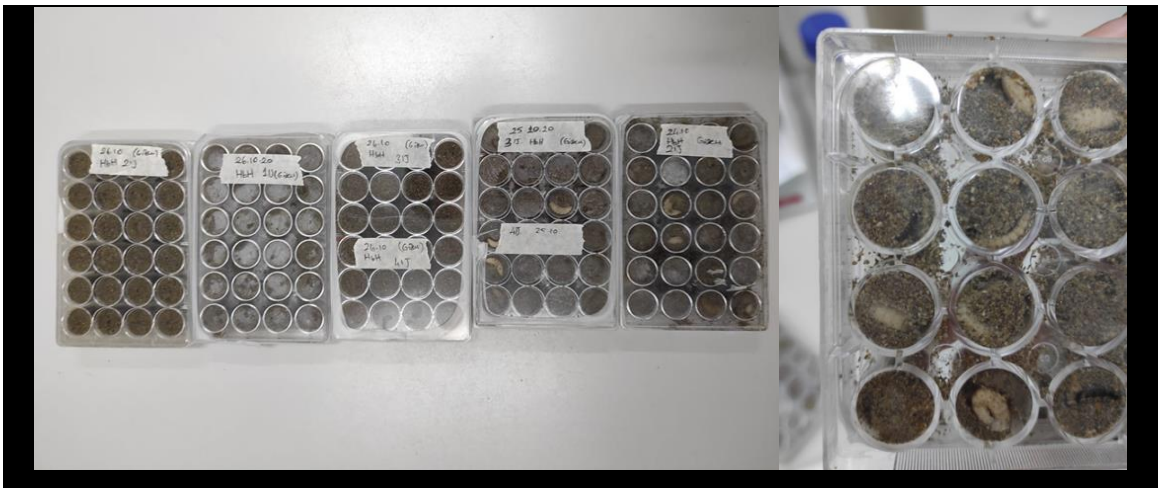
Şekil 3. 24. Hermafrodit bireylerin sayımı

3.7. *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının Etkinliği

Otoklav ile toprak sterilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Kuyucuklu platelere her bir kuyucuğa 1 adet larva yerleştirilerek üzeri toprak ile kapatılmıştır. 1 IJ, 2 IJ, 3 IJ, 4 IJ, 5 IJ, 10 IJ, 25 IJ, 50 IJ dozlarında *in vivo* ve *in vitro* yöntemi ile üretilen IJ' ler *G. mellonella*' lara uygulanmıştır. 25 ºC' de enfeksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlem 5 kez tekerrür edilmiştir. Her tekkerrürde 50 adet *G. mellonella* bireyi kullanılmıştır. Enfeksiyon denemesi kurulduktan 3 gün sonra ölmüş olan larvaların sayımı yapılmıştır.



Şekil 3. 25. *Galleria mellonella* larvalarının belirli dozlarda enfeksiyon denemelerinin kurulumu



Şekil 3. 26. Enfekte edilen *Galleria mellonella* larvalarının bulunduğu kuyucuklu kapların etiketlenmesi



Şekil 3. 27. Enfekte olan *Galleria mellonella* larvalarının canlı ve ölü sayılarının belirlenmesi

3.8. İstatistiksel Analizler

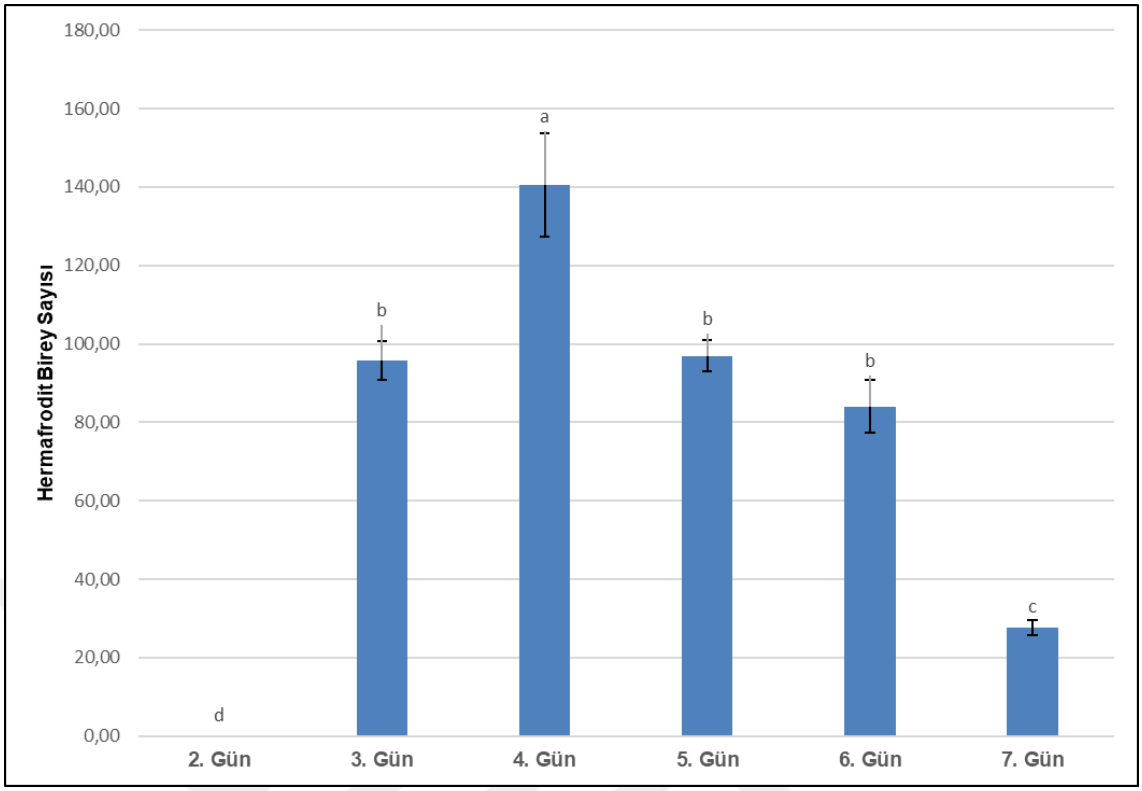
Heterorhabditis bacteriophora HBH ırkının *in vivo* ve *in vitro* üreme potansiyeli ile etkinliğinin belirlenmesinde, istatistiksel farklılıkları tespit etmek amacıyla tek yönlü ANOVA (varyans analizi) yöntemi kullanılmıştır. Muamele ortalamalarının karşılaştırılmasında $\alpha = 0,05$ düzeyinde LSD (Least Significant Differences) testi uygulanmıştır. Tüm analizler JMP® 11.0 yazılımı kullanılarak yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *In vivo* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının Üreme Potansiyeli

Bu çalışmasında, test böceği olarak kullanılan *Galleria mellonella* olgun larvaları *H. bacteriophora* HBH ırkı nematod ile 100 IJ dozunda enfeksiyon denemesi kurulmuştur. Bu uygulamanın ardından 2., 3., 4., 5., 6., 7. günler olmak üzere her gün 10' ar adet *Galleria melonella* larvası disekte edilerek oluşan hermafrodit birey sayımı yapılmıştır. *H. bacteriophora* HBH ırkına ait hermafrodit birey sayısı, günler arasında istatistiksel olarak önemli ölçüde farklılık göstermiştir (F=55.1054; df=5, 176; p=<0.0001) (Şekil 4. 1.).

Disekte edilen *Galleria mellonella* larvalarındaki *H. bacteriophora* HBH ırkına ait hermafrodit birey sayısı 4. gün istatistiksel olarak maksimum seviyede olduğu tespit edilmiştir. 3., 5., ve 6. gün elde edilen hermafrodit birey sayısı istatistiksel olarak aynıdır. Fakat 2. ve 7. günlerdeki birey sayılarına kıyasla daha yüksek düzeydedir. İstatistiksel olarak en düşük hermafrodit birey sayısı 2. gün elde edilmiştir. (F=55.1054; df=5, 176; p=<0.0001) (Şekil 4. 2.).

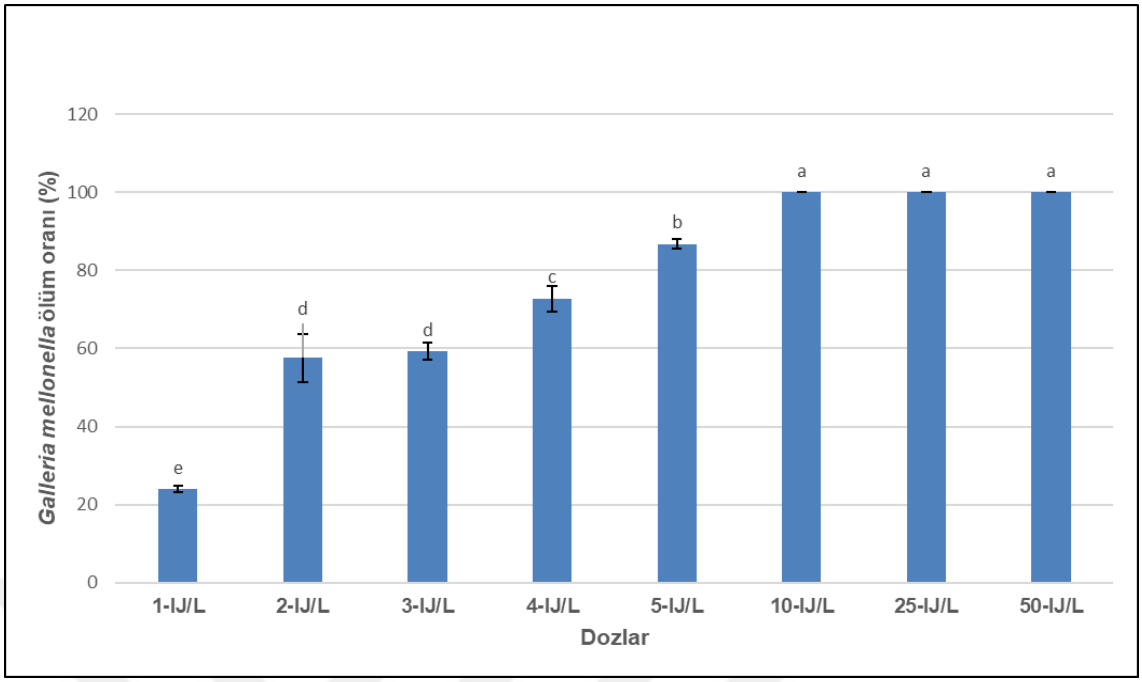


Şekil 4. 1. *In vivo* üretim sonucu elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerin oluşturduğu enfeksiyon denemesi sonucu *Galleria mellonella* larvası kadavraları içerisinden çıkan ve sayılan hermafrodit birey sayısı (F=55.1054; df=5, 176; p=<0.0001)

4.2. *In vivo* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının *Galleria mellonella*' ya Karşı Etkinliği

H. bacteriophora HBH ırkı nematod ile 1 IJ, 2IJ, 3IJ, 4IJ, 5IJ, 10IJ, 25IJ, 50 IJ dozlarında enfeksiyon denemesi kurulmuştur. Bu uygulamanın ardından 24 kuyucuklu kaplar 3 gün sonra açılmıştır. İçerisindeki ölü ve canlı *G. mellonella* larvalarının sayımı yapılmıştır.

Uygulamadan 3 gün sonra *H. bacteriophora* HBH' nın birbirinden farklı dozları (1 IJ, 2IJ, 3IJ, 4IJ, 5IJ, 10IJ, 25IJ, 50 IJ) *G. mellonella* larvalarına karşı önemli ölçüde öldürücü etki göstermiştir. Dozlar arasında, *G. mellonella* larvalarına karşı etkinlik bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlenmiştir. 10IJ, 25IJ, 50 IJ dozları *G. mellonella* larvalarına karşı istatistiksel olarak en yüksek öldürücü etkiyi göstermiştir. 10IJ, 25IJ, 50 IJ dozlarının etkinliği istatistiksel olarak birbirleri ile aynı etkidedir. 5 IJ dozunun 1 IJ, 2IJ, 3IJ ve 4IJ dozlarına kıyasla *G. mellonella* larvalarına karşı etkinliği istatistiksel olarak daha yüksektir. 4 IJ dozu 1 IJ, 2IJ, 3IJ dozlarına kıyasla *G. mellonella* larvalarına karşı etkinliği istatistiksel olarak daha yüksektir. 2 IJ ve 3 IJ dozlarının *G. mellonella* larvalarına karşı etkinlikleri istatistiksel olarak aynı olup, 1 IJ dozuna kıyasla daha yüksektir ($F=85.8215$; $df=7, 32$; $p=<0.0001$) (Şekil 4. 3.).



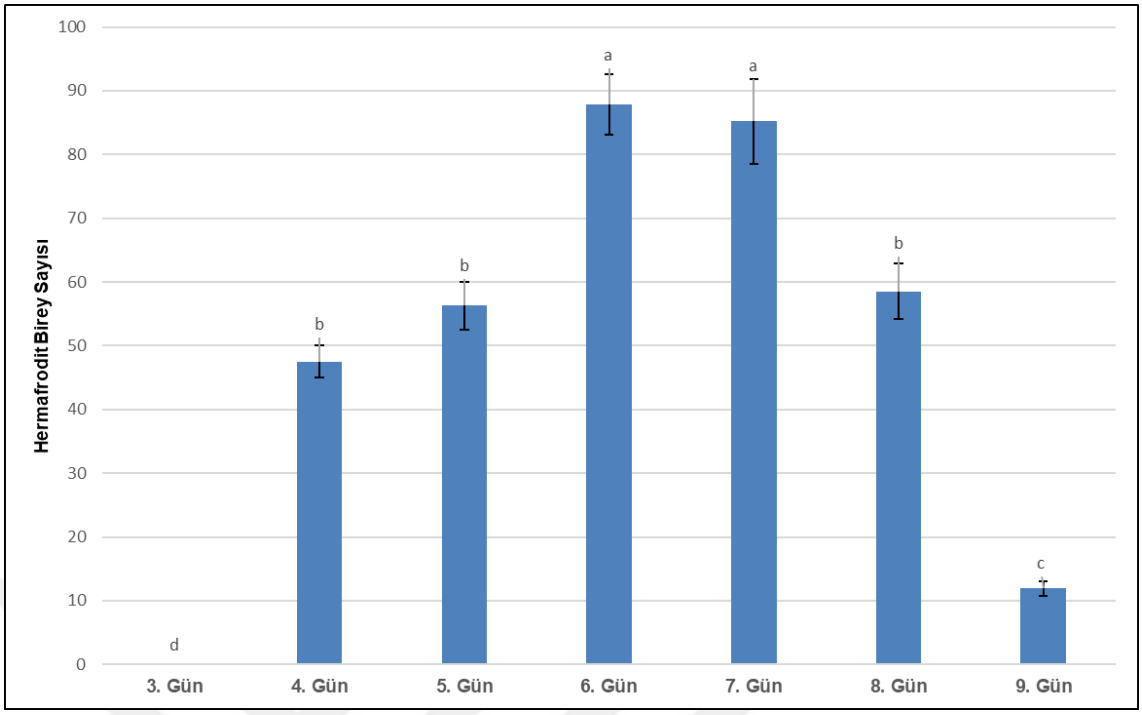
Şekil 4. 2. *In vivo* üretim sonucu elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı bireylerin oluşturduğu enfeksiyon denemesi sonucu uygulama dozlarına göre *Galleria mellonella* larvalarının ölüm oranı (F=85.8215; df=7, 32; p=<0.0001)

4.3. *In vitro* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının Üreme Potansiyeli

In vivo üretim sonucu oluşan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının üreme potansiyelinin incelenmesinde uygulanan deneme aynı şekilde *in vitro* yöntemiyle elde edilen EPN' ler içinde kurulmuştur.

H. bacteriophora HBH ırkı nematod ile 100 IJ dozunda enfeksiyon denemesi kurulmuştur. Bu uygulamanın ardından 2., 3., 4., 5., 6., 7., 8., 9. günler olmak üzere her gün 10' ar adet *G. mellonella* larvası disekte edilerek oluşan hermafrodit birey sayımı yapılmıştır. *H. bacteriophora* HBH ırkına ait hermafrodit birey sayısı, günler arasında istatistiksel olarak önemli ölçüde farklılık göstermiştir ($F=71.0419$; $df=6, 203$; $p=<0.0001$) (Şekil 4. 4.).

6. ve 7. günler disekte edilen *G. mellonella* larvalarındaki *H. bacteriophora* HBH ırkına ait hermafrodit birey sayısı 3.,4.,5., 8. ve 9. günlere kıyasla istatistiksel olarak aynı oldukları ve maksimum seviyede olduğu tespit edilmiştir. 4., 5. ve 8. gün elde edilen hermafrodit birey sayısı, istatistiksel olarak aynıdır fakat 3. ve 9. günlerdeki birey sayılarına kıyasla daha yüksek düzeydedir. İstatistiksel olarak en düşük hermafrodit birey sayısı 3. gün elde edilmiştir ($F=71.0419$; $df=6, 203$; $p=<0.0001$) (Şekil 4. 5.).



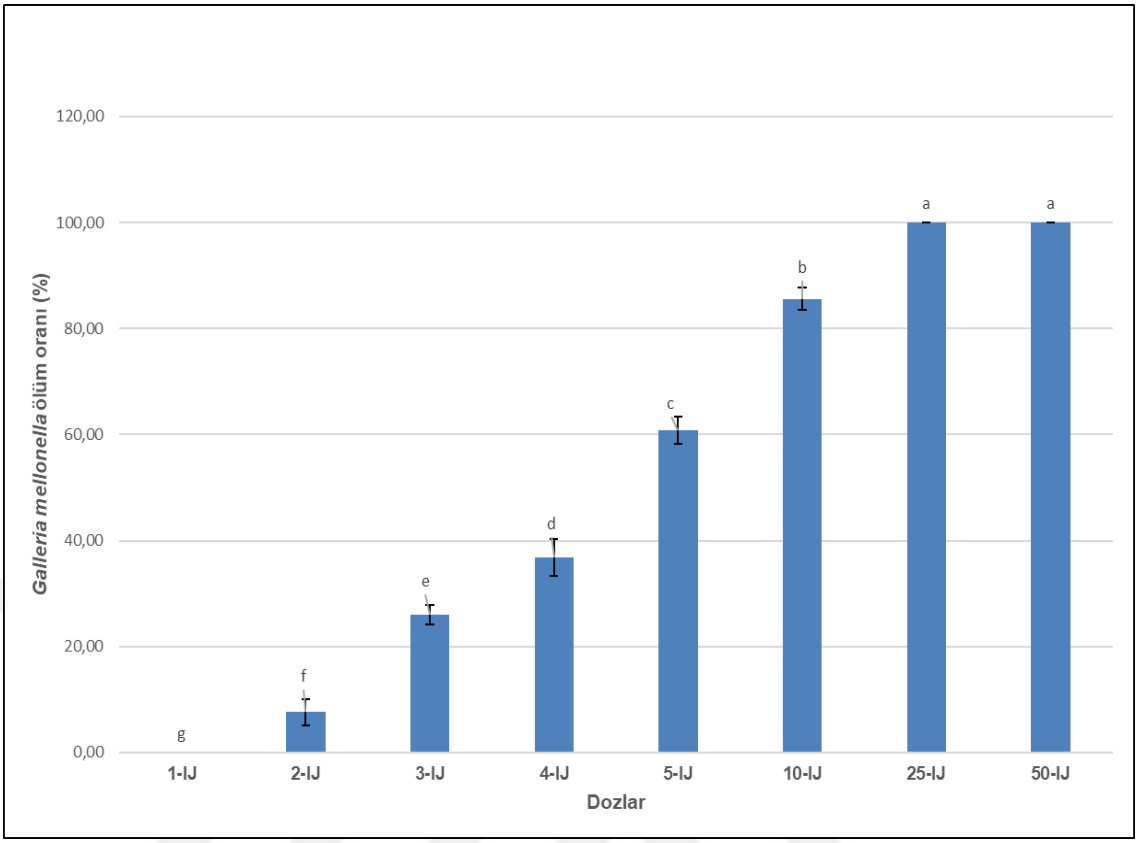
Şekil 4.3. *In vitro* üretim sonucu elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH bireylerin oluşturduğu enfeksiyon denemesi sonucu *Galleria mellonella* larvası kadavraları içerisinden çıkan ve sayılan hermafrodit birey sayısı (F=71.0419; df=6, 203; p=<0.0001)

4.4. *In vitro* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkının *Galleria mellonella*' ya Karşı Etkinliği

In vivo üretim sonucu oluşan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkının etkinliğinin incelenmesinde uygulanan deneme aynı şekilde *in vitro* yöntemiyle elde edilen EPN' ler içinde kurulmuştur.

In vivo üretim sonucu elde edilmiş olan *H. bacteriophora* HBH ırkı nematod ile 1 IJ, 2IJ, 3IJ, 4IJ, 5IJ, 10IJ, 25IJ, 50 IJ dozlarında enfeksiyon denemesi kurulmuştur. Bu uygulamanın ardından 24 kuyucuklu kaplar 3 gün sonra açılmıştır. İçerisindeki ölü ve canlı *Galleria mellonella* larvalarının sayımı yapılmıştır.

Uygulamadan 3 gün sonra *H. bacteriophora* HBH' nın birbirinden farklı dozları (1 IJ, 2IJ, 3IJ, 4IJ, 5IJ, 10IJ, 25IJ, 50 IJ) *G. mellonella* larvalarına karşı önemli ölçüde öldürücü etki göstermiştir. Dozlar arasında, *G. mellonella* larvalarına karşı etkinlik bakımından istatistiksel olarak önemli farklılıklar gözlemlenmiştir. 25IJ, 50 IJ dozları *G. mellonella* larvalarına karşı istatistiksel olarak en yüksek öldürücü etkiyi göstermiştir. 25IJ ve 50 IJ dozlarının etkinliği istatistiksel olarak birbirleri ile aynı etkidedir. 10 IJ dozunun *G. mellonella* larvalarına karşı etkinliği, 1 IJ, 2IJ, 3IJ, 4IJ, 5IJ dozlarına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksektir. 5 IJ dozu *G. mellonella* larvalarına karşı etkinliği 1 IJ, 2IJ, 3IJ, 4IJ dozlarına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksektir. 4 IJ dozunun *G. mellonella* larvalarına karşı etkinliği 1 IJ, 2IJ, 3IJ dozlarına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksektir. 3 IJ dozunun *G. mellonella* larvalarına karşı etkinliği 1 IJ ve 2 IJ dozlarına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksektir. İstatistiksel olarak bakıldığında en düşük üreme potansiyeli 1 IJ dozunda belirtilmiştir ($F=322.3966$; $df=7, 32$; $p=<0.0001$) (Şekil 4. 4.).

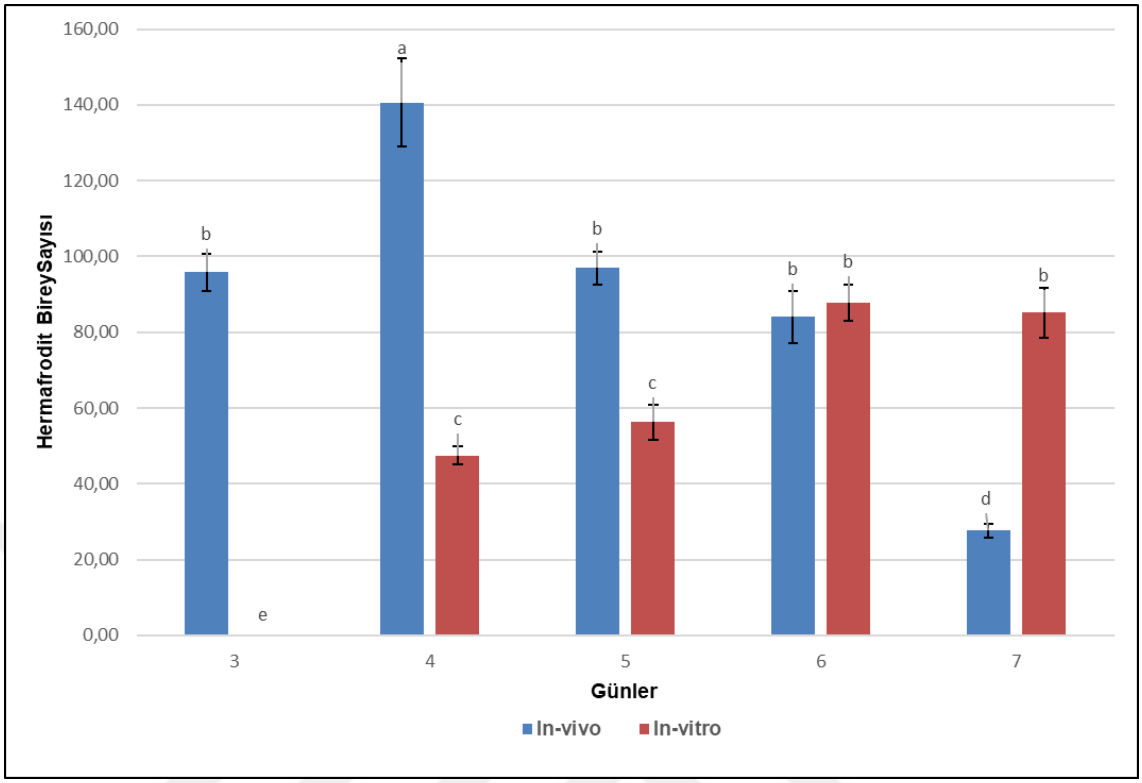


Şekil 4.4. *In vitro* üretim sonucu elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı bireylerin oluşturduğu enfeksiyon denemesi sonucu uygulama dozlarına göre *Galleria mellonella* larvalarının ölüm oranı (F=322.3966; df=7, 32; p=<0.0001)

4.5. *In vivo* ve *In vitro* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkı EPN' lerin Üreme Potansiyelinin Karşılaştırılması

Uygulama boyunca gözlemlenen 3., 4., 5., 6. ve 7. günler sonunda, disekte edilen *Galleria mellonella* larvalarından elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkına ait hermafrodit birey sayıları *in vivo* ve *in vitro* yöntemleri ile ayrı ayrı tespit edilmiştir. *In vivo* ve *in vitro* yöntemleri sonucunda elde edilen hermafrodit birey sayıları arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar tespit edilmiştir.

Heterorhabditis bacteriophora HBH ırkının *in vivo* üretim aşamasında, enfeksiyon başlangıcından 3 gün sonra *G. mellonella* kadavralarının disekte edilmesiyle ortalama 95,8 adet hermafrodit birey tespit edilmiştir. *In vitro* üretim aşamasında ise enfeksiyon başlangıcından 3 gün sonra hermafrodit birey tespit edilememiştir. *In vivo* üretimiyle, 4. günde *G. mellonella* kadavralarının disekte edilmesiyle elde edilen ortalama 140,59 adet olan hermafrodit birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen ortalama 47,50 adet olan hermafrodit birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek düzeydedir. *İn vivo* üretimiyle, 5. günde *G. mellonella* kadavralarının disekte edilmesiyle elde edilen ortalama 96,97 adet olan hermafrodit birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen ortalama 56,30 adet olan hermafrodit birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek düzeydedir. *İn vivo* üretimiyle, 6. günde *G. mellonella* kadavralarının disekte edilmesiyle elde edilen ortalama 84,10 adet olan hermafrodit birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen ortalama 87,80 adet olan hermafrodit birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak aynı düzeydedir. In vivo üretimiyle, 7. günde *G. mellonella* kadavralarının disekte edilmesiyle elde edilen ortalama 27,67 adet olan hermafrodit birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen ortalama 85,20 adet olan hermafrodit birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak daha düşük düzeydedir ($F=42.8084$; $df=9, 292$; $p=<0.0001$) (Şekil 4. 6.).



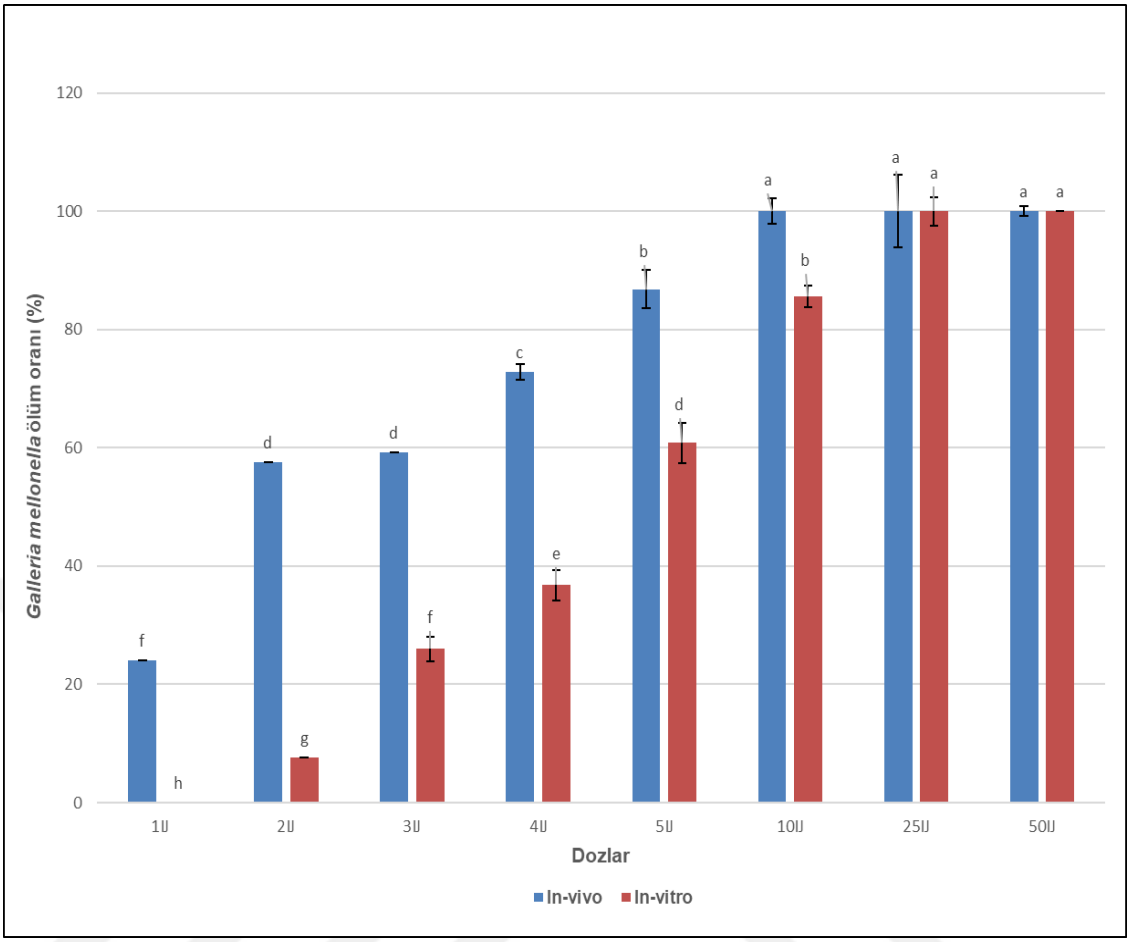
Şekil 4.5. *In vivo* ve *in vitro* üretim sonucu elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı bireylerin *Galleria mellonella* larvalarına karşı üreme potansiyelinin karşılaştırılması grafiği (F=42.8084; df=9, 292; p=<0.0001)

4.6. *In vivo* ve *In vitro* Üretim Sonucu Elde Edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH Irkı EPN' lerin Etkinliğinin Karşılaştırılması

1 IJ, 2 IJ, 3 IJ, 4 IJ, 5 IJ, 10 IJ, 25 IJ, 50 IJ dozlarında olacak şekilde *G. mellonella* larvalarına *in vivo* ve *in vitro* yöntemleri sonucunda elde edilmiş olan *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkına ait hermafrodit birey sayıları ayrı ayrı tespit edilmiştir. *In vivo* ve *in vitro* yöntemleri sonucunda elde edilen hermafrodit birey sayıları arasında istatistiksel olarak önemli farklılıklar tespit edilmiştir.

Heterorhabditis bacteriophora HBH ırkının *in vivo* üretimiyle, *G. mellonella* larvalarının 50 IJ dozunda nematoda maruz bıraklıması sonucunda *G. mellonella* larvalarının ölü birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen *G. mellonella* larvalarının ölü birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak aynı düzeydedir. Her iki üretim yöntemiyle elde edilmiş olan nematodların 50 IJ dozunda uygulanması sonucunda *G. mellonella* larvalarının tamamının enfekte olduğu gözlemlenmiştir. *In vivo* üretimiyle, *G. mellonella* larvalarının 25 IJ dozunda nematoda maruz bırakılması sonucunda *G. mellonella* larvalarının ölü birey sayısı olan, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen *G. mellonella* larvalarının ölü birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak aynı düzeydedir. Her iki üretim yöntemiyle elde edilmiş olan nematodların 25 IJ dozunda uygulanması sonucunda *G. mellonella* larvalarının tamamının enfekte olduğu gözlemlenmiştir *In vivo* üretimiyle, *G. mellonella* larvalarının 10 IJ dozunda nematoda maruz bıraklıması sonucunda *G. mellonella* larvalarının ortalama 100 adet olan ölü birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen *G. mellonella* larvalarının ortalama 85,6 adet ölü birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek düzeydedir. *In vivo* üretimiyle, *G. mellonella* larvalarının 5 IJ dozunda nematoda maruz bıraklıması sonucunda *G. mellonella* larvalarının ortalama 86,8 adet olan ölü birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen *G. mellonella* larvalarının ortalama 60,8 adet olan ölü birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek düzeydedir. *In vivo* üretimiyle, *G. mellonella* larvalarının 4 IJ dozunda nematoda maruz bıraklıması sonucunda *G. mellonella* larvalarının ortalama 72,8 adet olan ölü birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen *G. mellonella* larvalarının ortalama 36,8 adet olan ölü birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek düzeydedir. *In vivo* üretimiyle, *G. mellonella* larvalarının 3 IJ

dozunda nematoda maruz bıraklıması sonucunda *G. mellonella* larvalarının ortalama 59,2 adet olan ölü birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen *G. mellonella* larvalarının ortalama 26 adet olan ölü birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek düzeydedir. *In vivo* üretimiyle, *G. mellonella* larvalarının 2 IJ dozunda nematoda maruz bıraklıması sonucunda *G. mellonella* larvalarının ortalama 57,6 adet olan ölü birey sayısı, *in vitro* yöntemi sonucu elde edilen *G. mellonella* larvalarının ortalama 7,6 adet olan ölü birey sayısına kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek düzeydedir. *In vivo* üretimi metoduyla elde edilen HBH ırkının, *G. mellonella* larvalarına karşı 1 IJ dozunda uygulanmasıyla ortalama 24 adet ölü *G. mellonella* larvası görülmüştür. Bunun aksine, *in vitro* üretim metoduyla elde edilen HBH ırkının *G. mellonella* larvalarına karşı 1 IJ dozunda uygulanması sonucu *G. mellonella* larvalarında ölüm görülmemiştir ($F=182.2937$; $df=15, 64$; $p=<0.0001$) (Şekil 4. 7.).



Şekil 4.6. *In vivo* ve *in vitro* sonucu elde edilen *Heterorhabditis bacteriophora* HBH ırkı bireylerin *Galleria mellonella* larvaları üzerindeki etkinliğinin karşılaştırılması grafiği (F=182.2937; df=15, 64; p=<0.0001)

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

EPN' ler simbiyotik bakterileri ile, tarımsal zararlılara karşı etkin ve spesifik bir öldürücü etkiye sahiptir (McMullen ve Stok 2014). Bu tez çalışmasında *Photorhabdus* bakterileri ile simbiyotik ilişki kuran *Heterorhabditis bacreriophora* HBH ırkı kullanılmıştır. Genellikle, bazı böcek takımlarının larva dönemleri (Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, vb.), uygun konukçu olarak kabul edilir. *In vivo* üretimi genellikle laboratuvarlarda, küçük ölçekte EPN kültürlerinin üretimi ve muhafazası amacı ile tercih edilebilmektedir. Nematodların ticari olarak kitlesel üretimi düşünüldüğünde bu yöntem uygun olmamaktadır. Çünkü bu yöntemde, çok miktarda böcek üretimi gerekmektedir. Bu sebeple zaman ve işçilik bakımından ek maliyetler ortaya çıkmaktadır (McMullen ve stok2014). *In vivo* yöntemiyle IJ üretimi, *in vitro* üretimine kıyasla kültürü daha kolay hazırlanabilen küçük ölçekte uygun fiyatlı bir yöntem olduğu ve yüksek kalitede EPN üretilebildiği bilinmektedir (Shapiro, Ilan ve Gaugler 2002). IJ' lerin *in vitro* yöntemiyle seri üretiminde risk, işletme yatırım maliyeti ve bilgi ihtiyacı daha yüksek (Ehlers 2001) olmasına rağmen ekonomik açıdan *in vivo* yöntemine kıyasla daha uygundur (Shapiro, Ilan ve Gaugler 2002). *In vivo* ve *in vitro* EPN üretiminde, etkinlik ve üreme potansiyeli bakımından farklılıklar görülebilmektedir (Tangchitsomk ve ark. 1993, Lunau ve ark. 1999, Ferreira ve ark. 2016). Bundan dolayı bu tez çalışması kapsamında, elde edilen patentli HBH hibrit ırkının *in vivo* ve *in vitro* (Katı-agar kültürü) üretiminde, dış faktörler sabit tutulup iki üretim sonucu oluşan IJ' lerin üreme potansiyeli ve etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Üreme potansiyelinin belirlenmesi için hermafrodit birey sayıları, etkinliğin belirlenmesi için ise üretim sonunda elde edilen IJ' ler ile enfekte edilen *Galleria mellonella* larvalarının ölüm oranları tespit edilmiştir.

Preez ve ark. (2020) Güney Afrika' da yaptığı çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* yöntemiyle üretilen EPN' ler, *Steinernema yirgalemense* ve *Steinernema jeffreyense* (Rhabditida: Steinernematidae), laboratuvar ortamında *Lobesia vanillana* larvalarına ve pupalarına karşı kullanılmıştır. Etkinlik bakımından, *in vitro* yöntemiyle üretilmiş olan *S. yirgalemense* (%98), *S. Jeffreyense*' den (%73) daha iyi performans göstermiştir. *İn vivo* üretimde ise, etkinlik bakımından *S. yirgalemense* ile *S. jeffreyense* arasında

istatistiksel açıdan önemli bir fark bulunamamıştır. Bu tez çalışmasında ise tek tür EPN ırkı (*Heterorhabditis bacteriophora* HBH) kullanılmıştır, *in vivo* ve *in vitro* yöntemi ile üretilen IJ' lerin (*H. bacteriophora* HBH) etkinlik açısından, dozlara bağlı bir şekilde önemli farklar oluşturdukları tespit edilmiştir. 1-10 IJ/larva dozlarında *in vivo* ile üretilmiş olan IJ' lerin etkinliği, *in vitro* yöntemine kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek düzeyde olmuştur. *Galleria mellonella*' ya karşı 10 IJ/larva dozunda, *in vivo* ile üretilmiş olan IJ' ler %100 oranında etkili olurken, *in vitro* ile üretilmiş olan IJ' ler %85,6 oranında etkili olurmuştur. Yine, Preez ve ark. (2020) çalışmasında üreme potansiyelini tespit etmek amacıyla, *in vivo* ve *in vitro* yöntemi ile elde edilen IJ' lerin enfejksiyonu sonucu uygulamadan 24 gün sonra, kadavralardan çıkış yapan yeni birey sayıları her iki yöntem için de birbirine yakın olduğu tespit edilmiştir (yaklaşık 850-950 IJ/larva). Ancak uygulamadan 44 gün sonra, *in vitro* yöntemi ile elde edilen IJ' lerin enfeksiyon denemesi sonucu kadavradan çıkan birey sayısı, *in vivo* yöntemine kıyasla daha yüksek düzeyde olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, *in vitro* yöntemiyle üretim potansiyelinin, *in vivo* yöntemine kıyasla zamana bağlı bir şekilde arttığı görülmektedir. Preez ve ark. (2020)' nın yaptığı araştırmaya benzer bir şekilde, bu tez çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* yöntemleri ile üretilen *H. bacteriophora* ırkı hermafrodit birey sayımı yapılarak üreme potansiyeli araştırılmıştır. *In vivo* üretim sonucu elde edilen bireyler ile üreme potansiyeli incelendiğinde; 72 saat sonra 95,8 adet hermafrodit birey elde edilmiştir. *In vitro* üretim sonucu elde edilen bireyler ile üreme potansiyeli incelendiğinde; 72 saat sonra hermafrodit birey elde edilememiştir. Ancak *in vivo* üretim sonucu elde edilen bireyler ile üreme potansiyeli incelendiğinde;168 saat sonra 27,67 adet hermafrodit birey elde edilirken, *in vitro* üretim sonucu elde edilen bireyler ile üreme potansiyeli incelendiğinde; 168 saat sonra 85,2 adet hermafrodit birey elde edilmiştir. Özet olarak, bu tez çalışmasında *in vitro* yöntemi ile üretilen IJ' lerin üreme potansiyeli, *in vivo* yöntemi ile üretilen IJ' lerin üreme potansiyeline kıyasla zamana bağlı bir şekilde daha etkin düzeye ulaştığı tespit edilmiştir. Ayrıca *in vitro* yöntemi ile üretilen IJ' lerin etkinliği uygulama dozunun arttırılmasıyla, *in vivo* yöntemi ile üretilen IJ' lerin etkinlik düzeyine ulaşabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca Preez ve ark. (2020)' in çalışmasında, Aynı nematod türlerinin *in vivo* ve *in vitro* kültürleri arasında, enfeksiyon kapasitesi açısından önemli bir fark tespit edilmemiştir. Benzer bir şekilde bu tez çalışmasında *in vivo* ve *in vitro* yöntemiyle elde edilen IJ' lerin *G. mellonella* larvalarına

karşı etkinlik oranları, 1-10 IJ/larva dozlarında farklılık göstermesine rağmen, 25-50 IJ/larva dozlarında istatistiksel olarak aynı düzeyde olup %100 oranında olduğu tespit edilmiştir. Literatürde bu tez çalışmasını destekleyen benzer araştırmalar bulunmaktadır (Tangchitsomk ve ark. 1993, Lunau ve ark. 1999, Ferreira ve ark. 2016).

Ferreira ve ark. (2016) etkinliği tespit etmek amacıyla *G. mellonella* larvalarına karşı *in vitro* ve *in vivo* yöntemiyle üretilmiş *S. yirgalemense* ve *H. zealandica* uygulanmıştır. 20 IJ/larva dozunda *in vivo* yöntemiyle üretilen *Steinernema yirgalemense*' nın *G. mellonella* larvalarına karşı etkinliği yaklaşık %100 iken, *in vitro* yöntemiyle üretilen *Steinernema yirgalemense*' nın *G. mellonella* larvalarına karşı etkinliği yaklaşık %80 değerinde olmuştur. Bu tez çalışmasında da benzer sonuçlar 1-10 IJ/larva dozlarında elde edilmiştir. Steyn ve ark. (2019)' nın yaptığı laboratuvar çalışmasında *in vitro* (Likit ortam) ve *in vivo* yöntemiyle üretilen IJ' lerin (*S. jeffreyense*) arasında, *Thaumatotibia leucotreta* larvalarına karşı etkinlik bakımından önemli bir fark tespit edilememiştir. *T. leucotreta* larvalarının enfekte olabilmesi için 50 IJ/larva dozu kullanılmıştır. Benzer şekilde bu tez çalışmasında *in vivo* ve invitro yöntemiyle elde edilen IJ' lerinin G. *mellonella* larvalarına karşı etkinliği, 25-50 IJ/larva dozlarında istatistiksel olarak aynı düzeyde olup %100 oranındadır. Ferreira ve ark. (2014)' in yaptığı çalışmada ise *Heterorhabditis zealandica* türüne ait IJ' ler, 200 IJs/larva dozunda *G. mellonella* larvalarına karşı kullanılmıştır. *In vivo* yöntemiyle elde edilen IJ' lerin etkinlik oranı yaklaşık %95 iken, *in vitro* yöntemiyle elde edilen IJ' lerin etkinlik oranı yaklaşık %75 olmuştuır. Bu tez çalışmasında ise, doz arttıkça *in vivo* ve *in vitro* sonucu elde edilen IJ' lerin üreme potansiyelleri ve etkinlikleri arasındaki fark azalmıştır. Bir diğer ifadeyle, 10 IJ/larva ve daha düşük dozlarda istatistiksel açıdan *in vivo* ve *in vitro* sonucu elde edilen IJ' lerin üreme potansiyelleri ve etkinlikleri arasındaki fark önemli düzeyde artmıştır. Ancak *in vivo* ve *in vitro* üretim sonucu elde edilen IJ' lerin etkinlikleri dozlara bağlı bir şekilde farklılık gösterdiği göz ardı edilmemelidir. Tüm bu araştırmalar, *in vivo* ve *in vitro* üretim ile elde edilen IJ' lerin zararlı konukçular üzerine farklı düzeylerde etkinlik gösterebileceğini kanıtlamaktadır. Ayrıca etkinliğin, sadece *in vivo* ve invitro üretim yöntemine bağlı olmadığı görülmektedir. Zararlı konukçular üzerine karşı gösterilen etkinlik oranı, EPN türüne ve uygulama dozlarına da bağlı

olduğu çeşitli çalışmalar ile tespit edilmiştir (Ferreira ve ark. 2014-2016, Steyn ve ark. 2019, Prezin ve ark. 2020).

Bütün bu çalışmalar ele alındığında, *in vivo* ve *in vitro* üretim yöntemleri EPN' lerin etkinliklerini ve üreme potansiyellerini önemli ölçüde değiştirebileceği görülmektedir. Ayrıca bu süreçteki doz, zaman ve tür seçimi EPN etkinliği ile üreme potansiyeli üzerine etkili olabileceği de görülmektedir. Bu tez çalışması, *in vivo* ve *in vitro* üretim yöntemlerinin geliştirilmesine ve bu üretim aşamalarındaki problemlerin çözümüne katkı sunmaktadır. *In vivo* ve *in vitro* üretim yöntemlerindeki eksikliklerin belirlenmesi, üretim işleyişinin daha ekonomik ve etkili hale getirilmesi amacıyla bu alanda ilave çalışmalar yapılmalıdır. EPN üretim işleyişinde ekonomik maaliyeti düşürürken yüksek düzeyde üreme patansiyeli ve etkinlik elde etmek, biyolojik mücadele kapsamında EPN kullanımını daha yaygın ve uygulanabilir hale getirecektir. Böylece çevreye zararlı, birçok kimyasalın sık kullanımının önüne geçilmesine katkı sunacaktır.

KAYNAKLAR

Alaboid, A., Bayhan, E., Gözel, U. 2019. Entomopatojen nematodların Kavun sineği (*Myiopardalis pardalina* (Bigot, 1891) (Diptera: Tephritidae) üzerindeki etkinliği. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 10(2): 111-117.

Aşçı, D. 2010. Entomopatojenik Nematodların (Steinernematidae ve Heterorhabditidae) doğal düşmanları üzerine araştırmalar. *Yüksek lisans tezi*. Adnan Menderes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın.

Blum, B., Kron Morelli, R., Vinotti, V., Ragni, A. 2009. Control of Curculio nucum, the hazelnut borer, by entomopathogenic nematodes. In VII International Congress on Hazelnut 845 (pp. 567-570).

Boemare, N.E., Akhurst, R.J., Mourant, R.G. 1993. DNA relatedness between *Xenorhabdus* spp. (Enterobacteriaceae), symbiotic bacteria of entomopathogenic nematodes, and a proposal to transfer *Xenorhabdus luminescens* to a new genus, *Photorhabdus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 43(2): 249-255.

Boff, M., Smits, P., Gerritsen, L., Wiegers, G. 2000. Development of the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis megidis* strain NLH-E 87.3 in *Galleria mellonella*. Nematology, 2(3): 303-308**.**

Chavarría-Hernández, N., Maciel-Vergara, G., Chavarría-Hernández, J. C., Castro-Rosas, J., Rodríguez-Pastrana, B. R., de la Torre-Martínez, M., Rodríguez-Hernández, A. I. 2011. Mass production of the entomopathogenic nematode, *Steinernema carpocapsae* CABA01, through the submerged monoxenic culture in two internal-loop airlift bioreactors with some geometric differences. *Biochemical engineering journal*, *55*(3): 145-153.

Chkhubianishvili T., Malania, I., Kakhadze, M. 2007. Susceptibility of entomopathogenic nematodes to the fall webworm *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae). Bulletin of the Georgian National Academy of Sciences, 175 (2): 175-178.

De Nardo, E. A., Grewal, P. S. 2003. Compatibility of *Steinernema feltiae* (Nematoda: Steinernematidae) with pesticides and plant growth regulators used in glasshouse plant production. *Biocontrol Science and Technology, 13*(4): 441-448.

Del Pino, F. G., Jové, M. (2005). Compatibility of entomopathogenic nematodes with fipronil. *Journal of helminthology*, *79*(4), 333.

Delen, N., Durmuşoğlu, E., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C., Burçak, A. 2005. Türkiye'de Pestisit Kullanimi, Kalinti ve Organizmalarda Duyarlilik Azalişi Sorunlari. *Türkiye Ziraat Mühendisligi*, *6*: 3-7.

Ehlers, R. U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. *Applied microbiology and biotechnology*, *56*(5): 623-633.

Ehlers, R.-U. 1996. Current and future use of nematodes in biocontrol: Practise and commercial aspects in regard to regulatory policies. *Biocontrol Science and Technology*, 6 (3): 303-316.

Ehlers, R.-U. 2001. Mass production of entomopathogenic nematodes for plant protection. Applied Microbiology and Biotechnology, 56: 623-633.

Ehlers, R.-U., Lunau, S., Krasomil-Osterfeld, K., Osterfeld, K.H. 1998. Liquid culture of the entomopathogenic nematode-bacterium complex *Heterorhabditis megidis/Photorhabdus luminescens*. *BioControl*, 43(1): 77-86.

Ehlers, R.-U., Peters, A. 1995. Entomopathogenic nematodes in biological control: Feasibility, perspectives and possible risks: Biological Control, Benefits and Risks, Ed.: Hokkanen, H.T., Lynch, J.M., Cambridge University Press, UK, pp: 119-136.

El-Sadawy, H. A. 2011. Mass production of *Steinernema spp*. on *in vitro* developed solid medium. *World Applied Sciences Journal*, *14*(6): 803-813.

Friedman, M. J. 1990. Commercial production and development.Pp. 153–172 in R. Gaugler and H. K. Kaya, eds. Entomopathogenic nematodes in biological control. Boca Raton, FL: CRC Press.

Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, Ed.: Gaugler, K., Kaya, H.K., CRC, Boca Raton, Florida, pp: 153-172.

Gaugler, R., Han, R. 2002a. Preface: Entomopathogenic Nematology, Ed.: Gaugler, R., CABI, UK, pp: 9-10.

Gaugler, R., Han, R. 2002b. Production technology: Entomopathogenic Nematology, Ed.: Gaugler, R., CABI, UK, pp: 289-310.

Georgis, R. 1990. Formulation and application technology: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, Ed.: Gaugler, R., Kaya, H.K., CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 173–191.

Gilmore, S. K., Potter, D. A. 1993. Potential role of Collembola as biotic mortality agents for entomopathogenic nematodes. *Pedobiologia (Jena), 37*(1): 30-38.

Glazer, I. 2002. Survival Biology: Entomopathogenic Nematology, Ed.: Gaugler, R., CABI, Wallinford, Oxon, UK, pp: 167-187.

Gorgadze, O., Lortkipanidze, M., Tailliez, P., Burjanadze, M., Kuchava, M., 2013. Field evalution of entomopathogenic nematodes for controlling fall webworm *Hypantria cunea* (Lepidoptera: Arctiidae) in West Georgia. IOBC-WPRS Bulletin 90, 2013. Proceedings of the meeting "Biological Control-its unique role in organic and integrated production" at Zagreb (Croatia), 16-20 June, 2013, 293-296.

Gözel, Ç., Gözel, U. 2019. The efficacy of native entomopathogenic nematodes against the pine processionary moth, Thaumetopoea pityocampa Den. & Schiff. (Lepidoptera: Thaumetopoeidae). *Turkish Journal of Biological Control*, 10 (2): 118-126

Gözel, Ç., Yılmaz A., Ataş, H., Gözel, U. 2020. Yerel entomopatojen nematodların Süne Eurygaster integriceps Puton, 1881 (Hemiptera: Scutelleridae) erginleri üzerindeki etkinliği. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*. 11(1): 139 – 148.

Gözel, Ç., Yılmaz A., Ataş, H., Gözel, U. 2020. Bazı entomopatojen nematodların etkinliğinin Patates güvesi *Phthorimaea operculella* Zeller (Lepidoptera: Gelechiidae)'nin mücadelesinde değerlendirilmesi. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi.11(2):165-175.*

Gözel, Ç., Yılmaz A., Ataş, H., Gözel, U. 2020. Yerel Entomopatojen Nematodların Elma iç kurdu *Cydia pomonella* Linnaeus (Lepidoptera: Tortricidae)' na Karşı Etkinlikleri. international congress on agriculture and forestry research 8-10 april Marmaris. 379-388

Grewal P.S., Ehlers R.U., Shapiro-Ilan D.I. 2005. Nematodes as biocontrol agents. CABI Publishing, USA, 506 p.

Grewal, P. S., Lewis, E. E., Gaugler, R., Campbell, J. F. 1994. Host finding behaviour as a predictor of foraging strategy in entomopathogenic nematodes. *Parasitology*, *108*(2): 207-216.

Griffin, C.T., Downes, M.J., Block, W. 1990. Test of antarctic soils for insect parasitic nematodes. *Antarctic Science*, 2:221-222.

Gürel, S., Gözel U.,2017. Düzce İli fındık bahçelerindeki entomopatojen nematod faunasının belirlenmesi ve fındık kurduna (*Curculio nucum* L.) (Col.: Curculionidae) karşı laboratuvarda etkinliklerinin araştırılması. *Türk. Biyo. Mücadele Derg.* 8 (1): 7-20.

Hirao, A., Ehlers, R. U. 2009. Influence of cell density and phase variants of bacterial symbionts (*Xenorhabdus* spp.) on dauer juvenile recovery and development of biocontrol nematodes *Steinernema carpocapsae* and *S. feltiae* (Nematoda: Rhabditida). *Applied microbiology and biotechnology*, *84*(1): 77-85.

Hominick, W.M. 2002. Biogeography: Entomopathogenic nematology, Ed.: Gaugler, R., CABI Puplishing, Oxon, UK, pp: 115-143.

Hominick, W.M., Reid, A.p., Bohan, D.A., Briscoe, B.R. 1996. Entomopathogenic nematodes – biodiversity, geographical distribution and the convention on biological diversity. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 317-331.

Hürkan, A., Gözel, Ç., Gözel, U. 2020. Bazı entomopatojen nematod türlerinin zeytin fidan tırtılı *Palpita unionalis* Hübner (Lepidoptera: Pyralidae)'e karşı virülensliğinin araştırılması. *Anadolu Tarım Bilimleri Dergisi*, *35*(3): 309-315.

İmren, M., Kasapoğlu, E. B., Dababat, A., Toktay, H., Elekcioğlu, I. H. 2014. Dayanıklılık Geni Cre1'in Akdeniz Tahıl Kist Nematodu, *Heterodera latipons* Franklin (Tylenchida: Heteroderidae)'e Karşı Etkinliğinin Araştırılması. *Tarım Bilimleri Dergisi*. 20(3): 261-268.

Kaya, H. K., Gaugler, R. 1993. Entomopathogenic nematodes. Annual Review of Entomology 38:181–206.

Kaya, H.K., Aguillera, M.M., Alumai, A., Choo, H.Y., Torre, M., Fodor, A., Ganguly, S., Hazır, S., Lakatos, T., Pye, A., Wilson, M., Yamanaka, S., Yang, H., Ehlers R.-U. 2006. Status of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria from selected countries or regions of the world. Biological Control, 38: 134-155.

Kaya, H.K., Mannion, C.M., Burlando, T.M., Nelsen, C. E. 1987. Escape of *Steinernema feltiae* from Alginate Capsules Containing Tomato Seeds. *Journal of Nematology*, 19(3):287-291.

Klein, M.G. 1990. Efficacy against soil-inhabiting insect pests: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, Ed.: Gaugler, R., Kaya, H.K., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 195-214.

Kongu, Y. 2012. Hibritlenen EPN *Heterorhabditis bacteriophora* ırklarının ebeveynlerine göre etkinliklerinin karşılaştırılması üzerine araştırmalar. *Yüksek lisans tezi*, Bursa Uludağ Üniversitesi, Bitki Koruma Anabilim Dalı, Bursa.

Koppenhöfer, A.M., Grewal, P.S., Kaya H.K. 2000. Synergism of entomopathogenic nematodes and imidacloprid against white grubs: greenhouse and field evaluation. Biological Control, 19 (3): 245-251.

Lacey, L. A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D. I., Frutos, R., Brownbridge, M., Goettel, M. S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: back to the future. *Journal of invertebrate pathology,132,* 1-41.

Lewis E., Gaugler, R., Harrison, R.,1992. Entomopathogenic nematode host finding response to host contact cues by cruise and ambush foragers. Parasitology, 105: 309-319.

Lewis, E.E., Clarke, D.J., 2012. Nematode parasites and entomopathogens. Insect Pathology Second Edition. (Editors: Vega, F., Kaya, H.K.) AcademicPress, USA, pp:395-424.

Lunau, S., Stoessel, S., Schmidt-Peisker, A.J., Ehlers, R.-U. 1993. Establishment of monoxenic inocula for scalling up *in vitro* cultures of the entomopathogenic nematodes *Steinernema* spp. and *Heterorhabditis* spp. Nematologica, 39: 385-399.

Mikaia N., 2008. Reproductive potential of an entomopathogenic nematode, *Steinernema feltiae*, on different hosts (*Galleria mellonella, Hyphantria cunea* and *Leptinotarsa decemlineata*). International Congress of Zoology, 26-29 August 2008, Paris, France.

Nguyen, K. B., Smart, G. C. 1995. Scanning electron microscope studies of *Steinernema glaseri* (Nematoda: Steinernematidae) 1. Nematologica, 41(1-4), 183-190.

Nicolopoulou-Stamati, P., Maipas, S., Kotampasi, C., Stamatis, P., Hens, L. 2016. Chemical Pesticides and Human Health: The Urgent Need for a New Concept in Agriculture. Article, 4: 1.

Nickle, W.R. 1984. History, Development and Importance of Insect Nematology: Plants and Insect Nematodes, Ed., Nickle, W.R., Marcel Dekker, New York, pp: 627-653.

Odendaal, D., Addison, M. F., Malan, A. P. 2016. Entomopathogenic nematodes for the control of the codling moth (*Cydia pomonella* L.) in field and laboratory trials. *Journal of helminthology*, *90*(5): 615.

Oerke, E. 2006. Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Science*, 144: 31–43.

Öncüer, C. 1995. Tarımsal Zararlılarla Savaş Yöntemleri ve İlaçları. Ege Üniversitesi Basım evi-3. Baskı, Bornova, İzmir, 333 s. Özer, N., Keskin, N., Kırbaş, Z. 1995. Occurrence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae: Heterorhabditidae) in Turkey. *Nematologica,* 41: 639-640.

Peters A., Sarraquigne, J.P., Blum, B., Kuske, S. 2007. Control of the Hazelnut Borer, *Curculio nucum*, with Entomopathogenic Nematodes. Insect Pathogens and Insect Parasitic Nematodes IOBC/wprs Bulletin, 30(1): 73-76.

Peters, A. 1996. The natural host range of *Steinernema* and *Heterorhabditis* spp. and their impact on insect populations. Biocontrol Science and Technology, 6(3): 389-402.

Poinar, G.O. JR. 1990. Biology and taxonomy of Steinernematidae and Heterorhanditidae: Entomopathogenic Nematodes in Biological Control, Ed.: Gaugler, R., Kaya, H.K., CRC Press, Boca Raton, Florida, pp: 23-62.

Poinar, G.O. JR., Thomas, G.M., Hess, R. 1977. Characteristics of the specific bacterium associated with *Heterorhabditis bacteriophora* (Heterorhabditidae: Rhabditida). Nematologica, 23: 97-102.

Pütz, J., Meinert, F., Wyss, U., Ehlers, R.-U. 1990. Development and application of oligonucleotide probes for molecular idendification of *Xenorhabdus* species. Applied and Enviromental Microbiology, 56 (1): 181-186.

Tagliente, F., Heinzpeter, E. W., Rovesti, L., Deseö, K. V. 1988. Compatibility of pesticides with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* Poinar (Nematoda: Heterorhabditidae). Nematologica 34 (4): 463–476.

Salame, L., I. Glazer, N. Miqaia, and Chkhubianishvili T. 2010. Characterization of Populations of Entomopathogenic Nematodes Isolated at Diverse Sites across Israel. Phytoparasitica, 38(1): 39-52.

Salem, S. A., Abdel-Rahman, H. A., Zebitz, C. P. W., Saleh, M. M. E., Ali, F. I., ElKholy, M.Y. 2008. Survival, pathogenicity and propagation of entomopathogenic nemaotdes under different temperatures. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 18(1): 91-98.

Shapiro-Ilan, D.I., Gaugler, R. 2002. Production technology for entomopathogenic nematodes and their bacterial symbionts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 28: 137-146.

Shapiro-Ilan, D.I., Stuart, R.J., McCoy, C.W. 2005. Characterization of biological control traits in the entomopathogenic nematode *Heterorhabditis mexicana* (MX4 strain). *Biological Control*, 32(1): 97-103.

Smart Jr. G.C., 1995. Entomopathogenic nematodes for the biological control of insects. *Supplement to Journal of Nematology*, 27: 529-534.

Strauch, O., Niemann, I., Neumann, A., Schmidt, A. J., Peters, A., Ehlers, R. U. 2000. Storage and formulation of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis indica* and *H. bacteriophora*. *BioControl*, *45*(4): 483-500.

Sulistyanto, D., Ehlers, R.-U. 1996. Efficacy of the entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis bacteriophora* for the control of grubs (*Phyllopertha horticola* and *Aphodius contaminatus*) in golf course turf. *Biocontrol Science and Technology*, 6: 247-250.

Susurluk, A., Ehlers, R.-U. 2008. Sustainable control of black vine weevil larvae, *Otiorhynchus sulcatus* (Coleoptera: Curculionidae) with *Heterorhabditis bacteriophora* in strawberry. *Biocontrol Science and Technology*, 18(6): 627-632.

Susurluk, I.A., Kumral, N.A., Peters, A., Bilgili, U., Açıkgöz, E. 2009. Pathogenicity, reproduction and foraging behaviours of some entomopathogenic nematodes on a new turf pest, *Dorcadion pseudopreissi* (Coleoptera: Cerambycidae). *Biocontrol Science and Technology*, 19(6): 585–594.

Şahin Ç. Gözel, U., 2019. Efficacy of entomopathogenic nematodes against neonate larvae of *Capnodis tenebrionis* (L., 1758) (Coleoptera: Buprestidae). *Turkish Journal of Entomology*, 43(3): 279-285.

Şahin, Y. S., Boucharı, A., Ulu, T. C., Sadıç, B., Susurluk, A. 2018. New application method for entomopathogenic nematode *Heterorhabditis bacteriophora* (Poinar, 1976)

(Rhabditida: Heterorhabditidae) HBH strain against *Locusta migratoria* (Linnaeus, 1758) (Orthoptera: Acrididae). *Türkiye Entomoloji Dergisi*, *42*(4): 305-312.

Toros, S., Maden, S., Sözeri, S. 1991. Tarımsal savaşım yöntem ve ilaçları. *Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yay*, *1222*, 332.

Ulu, T. C., Susurluk, I. A. 2014. Heat and desiccation tolerances of *Heterorhabditis bacteriophora* strains and relationships between their tolerances and some bioecological characteristics. *Invertebrate Survival Journal*, 11(1): 4-10.

Ulu, T.C., Sadic, B., Susurluk, İ.A. 2016. Bazı pestisitlerin EPN olan *Steinernema feltiae* TUR-S3 üzerine etkileri. *Türkiye Biyolojik Mücadele Dergisi*, 7(1): 55-64.

Ulu, Tufan., Sadiç, Büşra., Susurluk, I. 2016. Effects of some pesticides on the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* TUR-S3. *Turkish Journal of Biological Control.* 7. 55-64.

Ulu, T. C. (2018). *Heterorhabditis bacteriophora* HBH hibrit ırkının *in vitro* katı kültürde üretiminin optimizasyonu. *Doktora tezi*. Bursa Uludağ Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü. Bitki Koruma Anabilim Dalı, Bursa.

Ünlü, İ.O., Özer, N. 2003. Evaluation of the reproductive potential and competition between two entomopathogenic nematodes, *Steinernema feltiae* Filipjev, 1934 (Rhabditida: Steinernematidae) and *Heterorhabditis bacteriophora*, Poinar 1976 (Rhabditida: Heterorhabditidae). *Turkish Journal of Biology*, 27: 149-155.

Woodring, J. L., and H. K. Kaya. 1988. Steinernematid and heterorhabditid nematodes: A handbook of biology and techniques. *Southern cooperative series bulletin* (USA).

Wright, D.J., Peters, A., Schroer, S., Fife, J.P. 2005. Application technology: Nematodes as biological control agents, Ed.: Grewal, P.S., Ehlers, R-U., Shapiro-Ilan, D.I., CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 91-106.

Yamanaka S., Seta, K., Yasuda, M., 1986. Evaluation of the use of entomogenous nematode, *Steinernema feltiae* (Str. Mexican) for the biological control of the fall webworm, *Hyphantria cunea*, (Lepidoptera: Arctiidae). *Japanese Journal of Nematology*, 16: 26-31.

Zervos, S., Johnson, S. C., Webster, J. M. 1991. Effect of temperature and inoculum size on reproduction and development of*Heterorhabditis heliothidis*and *Steinernema*

glaseri (Nematoda: Rhabditoidea) in *Galleria mellonella*. *Canadian Journal of Zoology* 69:1261–1264

Zioni, S., Glazer, I., Segal, D. 1992. Life cycle and reproductive potential of the nematode *Heterorhabditis bacteriophora* strain HP88. *Journal of nematology*, 24(3), 352.